

Université de Montréal

# **Remodelage électrique cardiaque dans des modèles murins de cardiomyopathies**

par

Katy Rivard

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de Doctorat  
en Sciences Pharmaceutiques  
option Pharmacologie

Octobre, 2010

© Katy Rivard, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Remodelage électrique cardiaque dans des modèles murins de cardiomyopathies

présentée par :  
Katy Rivard

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Daniel Lévesque, président-rapporteur  
Céline Fiset, directrice de recherche  
Jonathan Ledoux, membre du jury  
Alain Coulombe, examinateur externe  
Lucie Parent, représentante du doyen de la FES

## Résumé

Les cardiomyopathies sont une atteinte du myocarde qui se présente sous différentes formes telles que l'hypertrophie ou la dilatation des chambres cardiaques. Ces maladies du muscle cardiaque peuvent affecter la contraction cardiaque et dégénérer en insuffisance cardiaque. Aussi, l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaques sont associées à une augmentation de la morbidité et de la mortalité cardiovasculaires principalement due au remodelage électrique et à la survenue d'arythmies. De plus, le retard de repolarisation, associé à une diminution des courants  $K^+$ , est un des troubles cardiaques les plus couramment observés lors de ces pathologies cardiaques.

L'angiotensine II (Ang II) et la norépinéphrine, principaux effecteurs du système rénine-angiotensine et du système nerveux sympathique, peuvent tous deux agir directement sur le cœur en liant les récepteurs de type 1 de l'Ang II (AT1) et les récepteurs adrénergiques. L'Ang II et la norépinéphrine sont associées au développement des cardiomyopathies, au remodelage cardiaque et à une prolongation de la durée du potentiel d'action cardiaque. Deux modèles de souris transgéniques surexprimant spécifiquement au niveau cardiaque les récepteurs AT1 (la souris AT1R) ou les récepteurs  $\alpha_{1B}$ -adrénergiques (la souris  $\alpha_{1B}$ -AR) ont été créés afin d'étudier les effets de ces stimuli sur le cœur. Ces deux modèles de souris développent du remodelage cardiaque, soit de l'hypertrophie chez les souris AT1R (cardiomyopathie hypertrophique) ou une dilatation des chambres cardiaques chez les souris  $\alpha_{1B}$ -AR (cardiomyopathie dilatée). Au stade avancé de la maladie, les deux modèles de souris transgéniques sont insuffisants cardiaques. Des données préliminaires ont aussi montré que les souris AT1R et les souris  $\alpha_{1B}$ -AR ont une incidence accrue d'arythmies ainsi qu'une prolongation de la durée du potentiel d'action. De plus, ces deux modèles de souris meurent subitement et prématurément, ce qui laissait croire qu'en conditions pathologiques, l'activation des récepteurs AT1 ou des récepteurs  $\alpha_{1B}$ -adrénergiques pouvait affecter la repolarisation et causer l'apparition d'arythmies graves. Ainsi, l'objectif de ce projet était de caractériser la repolarisation ventriculaire des souris AT1R et  $\alpha_{1B}$ -AR afin de déterminer si

la suractivation chronique des récepteurs de l'Ang II ou des récepteurs  $\alpha_{1B}$ -adrénergiques pouvait affecter directement les paramètres électrophysiologiques et induire des arythmies.

Les résultats obtenus ont révélé que les souris AT1R et les souris  $\alpha_{1B}$ -AR présentent un retard de repolarisation (prolongation de l'intervalle QTc (dans l'électrocardiogramme) et de la durée du potentiel d'action) causé par une diminution des courants  $K^+$  (responsables de la repolarisation). Aussi, l'incidence d'arythmies est plus importante dans les deux groupes de souris transgéniques comparativement à leur contrôle respectif. Finalement, nous avons vu que les troubles de repolarisation se produisent également dans les groupes de souris transgéniques plus jeunes, avant l'apparition de l'hypertrophie ou du remodelage cardiaque. Ces résultats suggèrent qu'en conditions pathologiques, l'activation chronique des récepteurs de l'Ang II ou des récepteurs  $\alpha_{1B}$ -adrénergiques peut favoriser le développement d'arythmies en retardant la repolarisation et cela, indépendamment de changements hémodynamiques ou du remodelage cardiaque. Les résultats de ces études pourront servir à comprendre les mécanismes responsables du développement d'arythmies cardiaques lors du remodelage et de l'insuffisance cardiaques et pourraient aider à optimiser le choix des traitements chez ces patients atteints ou à risque de développer de l'hypertrophie ou du remodelage cardiaque.

**Mots-clés :** Récepteur de type 1 de l'angiotensine II, Récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénergique, Courants ioniques, Cardiomyopathies, Repolarisation ventriculaire, Arythmies cardiaques, Souris transgéniques.

## Abstract

Cardiomyopathies are diseases of the myocardium that may have several causes and comes in different forms such as cardiac hypertrophy or dilatation. Cardiomyopathies are often progressive diseases that cause a loss of heart function and lead to heart failure. In addition, hypertrophy and heart failure are associated with increased morbidity and mortality mainly due to electrical remodeling and arrhythmias. Delayed repolarization associated with a decrease of  $K^+$  currents, is one of the most common cardiac disorders associated with cardiac remodeling.

Angiotensin II (Ang II) and norepinephrine, the main effectors of the renin-angiotensin system and of the sympathetic nervous system, can both act directly on the heart by binding the Ang II type 1 receptor (AT1) and the adrenergic receptors. Ang II and norepinephrine are both associated with the development of cardiomyopathy, cardiac remodeling and prolongation of action potential duration. Two transgenic mouse models overexpressing the AT1 receptors (AT1R mouse) or the  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptors ( $\alpha_{1B}$ -AR mouse) specifically in the myocardium have been developed to study the effects of these stimuli on the heart. These two mouse models developed cardiac remodeling such as hypertrophy for the AT1R mice (hypertrophic cardiomyopathy) and dilatation of cardiac chambers for  $\alpha_{1B}$ -AR mice (dilated cardiomyopathy). In advanced stage of the disease, the two transgenic mouse models exhibit heart failure. Preliminary data showed that both transgenic mouse models experience cardiac arrhythmias and have a prolongation of the action potential duration. Moreover, AT1R and  $\alpha_{1B}$ -AR mice die suddenly and prematurely, which suggested that in pathological conditions, activation of the Ang II type 1 receptor or of the  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor may affect repolarization and can be responsible for the incidence of serious arrhythmias causing the death of these mice. Base on these informations, the objective of this project was to characterize the ventricular repolarization in AT1R and  $\alpha_{1B}$ -AR mice to see if an increase of the activation of the Ang II type 1 receptor or of the  $\alpha_{1B}$ -adrenergic

receptor could directly affect electrophysiological parameters and lead to severe arrhythmias.

Results showed that both AT1R mice and  $\alpha_{1B}$ -AR mice have a delayed ventricular repolarization (prolongation of the QTc interval and action potential duration) caused by a decrease in outward  $K^+$  currents (responsible for the repolarization). In addition, the incidence of arrhythmias is higher in both groups of transgenic mice compared with their respective control. Finally, we have seen that repolarization disorders also occur in younger mice of both models of cardiomyopathy that do not present sign of hypertrophy and cardiac remodeling. These results suggest that under pathological conditions, the overactivation of the Ang II type 1 receptor or of the  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor can directly promote the development of arrhythmias by delaying the repolarization independently of hemodynamic variations and pathological phenotype. The results of these studies can be useful to understand the mechanisms underlying the development of cardiac arrhythmias in patients suffering from cardiac hypertrophy or failure and may help to choose the best treatment for these patients.

**Keywords :** Ang II type 1 receptor,  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor, Cardiac arrhythmia, Ion currents, Cardiomyopathy, Ventricular Repolarization, Transgenic mouse.

# Table des matières

|   |          |
|---|----------|
| <b>Chapitre 1 Introduction</b>  | <b>1</b> |
| 1.1 Physiologie cardiaque   | 2        |
| 1.1.1 Les paramètres de l'excitabilité cardiaque  | 2        |
| 1.1.2 Les courants ioniques et la contraction cardiaque   | 11       |
| 1.2 Les cardiomyopathies  | 14       |
| 1.2.1 La classification des cardiomyopathies  | 14       |
| 1.2.2 Mécanismes compensatoires aux cardiomyopathies  | 16       |
| 1.2.3 Signalisation intracellulaire impliquée dans le remodelage                                  | 18       |
| 1.2.4 Les stimuli produisant le remodelage cardiaque  | 25       |
| 1.2.5 Remodelage et régulation des paramètres d'électrophysiologie cardiaque                      | 26       |
| 1.2.6 Régulation de l'homéostasie du $\text{Ca}^{2+}$   | 33       |
| 1.2.7 Arythmies associées avec le remodelage cardiaque  | 34       |
| 1.2.8 Résumé de la pathophysiologie des cardiomyopathies  | 35       |
| 1.3 L'angiotensine II   | 36       |
| 1.3.1 La biosynthèse de l'angiotensine II   | 36       |
| 1.3.2 Les récepteurs de l'angiotensine II   | 38       |
| 1.3.3 Le rôle de l'angiotensine II  | 41       |
| 1.3.4 Résumé du rôle de l'Ang II sur le système cardiovasculaire                                  | 47       |
| 1.3.5 La souris transgénique AT1R   | 47       |
| 1.4 Le système adrénergique   | 49       |
| 1.4.1 Introduction au système adrénergique  | 49       |
| 1.4.2 La synthèse des catécholamines  | 49       |
| 1.4.3 Les récepteurs adrénergiques  | 51       |
| 1.4.4 Effets cardiaques des récepteurs $\alpha_1$ -adrénergiques                                  | 56       |
| 1.4.5 Résumé du rôle de l'activation des récepteurs $\alpha_1$ -adrénergiques au niveau cardiaque | 62       |
| 1.4.6 La souris transgénique $\alpha_{1B}$ -AR  | 62       |

|  |            |
|--|------------|
| 1.5 Résumé de l'état des connaissances, buts de la thèse .....                                   | 65         |
| <b>Chapitre 2 Caractérisation de la repolarisation ventriculaire chez les souris</b>             |            |
| <b>surexprimant le récepteur de type 1 de l'angiotensine II au niveau cardiaque .....</b>        | <b>68</b>  |
| 2.1 Avant propos .....   | 69         |
| 2.1.1 Introduction .....   | 69         |
| 2.1.2 Contribution des auteurs .....   | 70         |
| 2.2 Article.....   | 71         |
| 2.2.1 Résumé / Abstract .....  | 72         |
| 2.2.2 Introduction .....   | 74         |
| 2.2.3 Methods.....   | 75         |
| 2.2.4 Results .....  | 77         |
| 2.2.5 Discussion .....   | 81         |
| 2.2.6 References .....   | 86         |
| 2.2.7 Figures / Figures Legend.....  | 91         |
| 2.2.8 Online data supplement.....  | 103        |
| <b>Chapitre 3 Caractérisation de la repolarisation ventriculaire chez les souris</b>             |            |
| <b>surexprimant le récepteur <math>\alpha_{1B}</math>-adrénergique au niveau cardiaque .....</b> | <b>109</b> |
| 3.1 Avant-Propos .....   | 110        |
| 3.1.1 Introduction .....   | 110        |
| 3.1.2 Contribution des auteurs .....   | 111        |
| 3.2 Article.....   | 112        |
| 3.2.1 Résumé / Abstract .....  | 113        |
| 3.2.2 Introduction .....   | 115        |
| 3.2.3 Materials and methods .....  | 116        |
| 3.2.4 Results .....  | 121        |
| 3.2.5 Discussion .....   | 129        |
| 3.2.6 References .....   | 135        |
| 3.2.7 Figures / Figures legend.....  | 142        |



|  |     |
|--|-----|
| <b>Chapitre 4 Discussion</b>   | 166 |
| 4.1 Résumé des principaux résultats  | 166 |
| 4.1.1 Mise en contexte   | 166 |
| 4.1.2 Caractérisation de la repolarisation ventriculaire des souris AT1R   | 167 |
| 4.1.3 Caractérisation de la repolarisation ventriculaire des souris $\alpha_{1B}$ -AR  | 168 |
| 4.2 Comparaison des deux modèles de cardiomyopathie  | 169 |
| 4.2.1 Comparaison des phénotypes pathologiques   | 169 |
| 4.2.2 Comparaison de la régulation des courants $K^+$ entre les souris AT1R et $\alpha_{1B}$ -AR                               | 170 |
| 4.2.3 Conséquences des troubles de repolarisation  | 173 |
| 4.3 Avancement   | 175 |
| 4.3.1 Rôle de l'Ang II dans le développement des arythmies   | 175 |
| 4.3.2 Rôle des récepteurs $\alpha$ -adrénergiques dans le développement des arythmies  | 176 |
| 4.3.3 Comparaison des mécanismes de régulation impliqués dans les différents phénotypes  | 176 |
| 4.3.4 Extrapolation des résultats obtenus avec les deux modèles de souris à la situation physiologique et pathologique humaine | 177 |
| 4.4 Autres facteurs pouvant contribuer aux arythmies et au remodelage cardiaques   | 184 |
| 4.4.1 Les courants calciques et la régulation de l'homéostasie du $Ca^{2+}$  | 184 |
| 4.4.2 Les différences entre les mâles et les femelles  | 188 |
| 4.5 Perspectives   | 190 |
| 4.5.1 Interaction entre le système rénine-angiotensine et le système nerveux sympathique                                       | 190 |
| 4.5.2 Influence des hormones sexuelles   | 191 |
| 4.6.1 Étude du courant $I_{CaT}$   | 192 |
| 4.7 Commentaire final  | 192 |
| <b>Bibliographie</b>   | 193 |
| <b>Annexe 1 CV Scientifique</b>  | 213 |

## Liste des figures

### Chapitre 1

|              |  |    |
|--------------|--|----|
| Figure 1. 1  | Illustration d'un électrocardiogramme.....   | 3  |
| Figure 1. 2  | Schématisation d'un potentiel d'action d'un cardiomyocyte ventriculaire d'humain.....                                  | 4  |
| Figure 1. 3  | Les courants $K^+$ activés au cours du potentiel d'action de cellules ventriculaires.....                              | 6  |
| Figure 1. 4  | Structure des canaux $K^+$ .....   | 6  |
| Figure 1. 5  | Troubles du rythme associés avec un retard de repolarisation.....  | 10 |
| Figure 1. 6  | Régulation de l'homéostasie du $Ca^{2+}$ intracellulaire.....  | 12 |
| Figure 1. 7  | Les cardiomyopathies.....  | 16 |
| Figure 1. 8  | Schéma de la signalisation intracellulaire associée avec l'activation des protéines G.....                             | 20 |
| Figure 1. 9  | Activation des protéines dépendantes du $Ca^{2+}$ et associées avec l'hypertrophie cardiaque.....                      | 24 |
| Figure 1. 10 | La biosynthèse de l'angiotensine II.....   | 37 |
| Figure 1. 11 | Les différentes voies de signalisation impliquées dans la réponse de la stimulation des récepteurs AT1.....            | 41 |
| Figure 1. 12 | Les différentes étapes de la synthèse des catécholamines.....  | 50 |
| Figure 1. 13 | Signalisation intracellulaire associée avec le couplage du récepteur $\alpha_1$ -adrénergique avec la protéine Gq..... | 55 |

### Chapitre 2

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Figure 2.1 | $K^+$ currents in 6-8 mo AT1R ventricular mouse myocytes.....   | 92 |
| Figure 2.2 | Steady-state inactivation and reactivation of $I_{to}$ in 6-8 mo AT1R ventricular mouse myocytes..... | 94 |
| Figure 2.3 | $K^+$ channel expression in 6-8 mo AT1R mouse ventricles.....   | 96 |

|            |   |     |
|------------|---|-----|
| Figure 2.4 | Ventricular repolarization and cardiac rhythm in 6-8 mo AT1R mice.....                                | 98  |
| Figure 2.5 | Cardiac function in 6-8 mo AT1R mice.....   | 100 |
| Figure 2.6 | Comparison of the ventricular repolarization phenotype between 6-8 mo and 50 days AT1R male mice..... | 102 |

### Chapitre 3

|             |   |     |
|-------------|---|-----|
| Figure 3.1  | Electrophysiological differences between 9-12 mo non-Tg and $\alpha_{1B}$ -AR mice.....                                     | 143 |
| Figure 3.2  | Comparison of total $K^+$ currents between 9-12 mo non-Tg and $\alpha_{1B}$ -AR mice.....                                   | 145 |
| Figure 3.3  | Comparison of the individual $K^+$ currents in ventricular myocytes isolated.....   | 147 |
| Figure 3.4  | Steady-state inactivation of $I_{to}$ and $I_{Kur}$ in 9-12 mo non-Tg and $\alpha_{1B}$ -AR mouse ventricular myocytes..... | 149 |
| Figure 3.5  | Reactivation of $I_{to}$ and $I_{Kur}$ in 9-12 mo non-Tg and $\alpha_{1B}$ -AR mouse ventricular myocytes.....              | 151 |
| Figure 3.6  | $K^+$ channels expression in 9-12 mo non-Tg and $\alpha_{1B}$ -AR ventricles.....   | 153 |
| Figure 3.7  | Spontaneous arrhythmias in 9-12 mo $\alpha_{1B}$ -AR mice.....  | 155 |
| Figure 3.8  | Spontaneous arrhythmias in 2-3 mo $\alpha_{1B}$ -AR mice.....   | 157 |
| Figure 3.9  | Ventricular repolarization in 2-3 mo non-Tg and $\alpha_{1B}$ -AR mice.....   | 159 |
| Figure 3.10 | Comparison of $K^+$ currents in ventricular myocytes isolated from 2-3 mo non-Tg and $\alpha_{1B}$ -AR mice .....           | 161 |
| Figure 3.11 | $K^+$ channels expression in 2-3 mo non-Tg and $\alpha_{1B}$ -AR ventricles.....  | 163 |
| Figure 3.12 | Protein expression of TASK-1 in non-Tg and $\alpha_{1B}$ -AR mice of both age groups.....                                   | 165 |

### Chapitre 4

|             |  |     |
|-------------|--|-----|
| Figure 4. 1 | Les stades de l'insuffisance cardiaque chronique et les traitements utilisés selon le cas..... | 181 |
|-------------|--|-----|

## Liste des abréviations

|                   |  |
|-------------------|--|
| $\alpha_1$ -AR    | : Le récepteur $\alpha_1$ -adrénergique  |
| $\alpha_{1B}$ -AR | : La souris transgénique surexprimant le récepteur $\alpha_{1B}$ -adrénergique au niveau cardiaque                   |
| AC                | : Adénylate cyclase  |
| AGN               | : Angiotensinogène   |
| AMP               | : Adénosine monophosphate  |
| AKT               | : Protéine kinase sérine/thréonine   |
| AMPC              | : AMP cyclique   |
| ANF               | : Facteur natriurétique auriculaire (« Atrial natriuretic factor »)  |
| Ang I             | : Angiotensine I   |
| Ang II            | : Angiotensine II  |
| AP                | : Facteur de transcription   |
| ARA               | : Antagoniste des récepteurs de type 1 de l'angiotensine   |
| ARN               | : Acide ribonucléique  |
| ARNm              | : ARN messenger  |
| ATP               | : Adénosine triphosphate   |
| AT1               | : Récepteur de type 1 de l'angiotensine II   |
| AT1a              | : Sous-type a du récepteur de type 1 de l'angiotensine II  |
| AT1b              | : Sous-type b du récepteur de type 1 de l'angiotensine II  |
| AT1R              | : Souris transgénique surexprimant le récepteur de type 1 de l'angiotensine II au niveau cardiaque                   |
| AT2               | : Récepteur de type 2 de l'angiotensine II   |
| Ca <sup>2+</sup>  | : Calcique, calcium  |
| CaM               | : Calmoduline  |
| CaMKII            | : Calmoduline kinase II  |
| Ca <sub>v</sub>   | : Canaux calciques dépendants du voltage   |
| DAD               | : Trouble du rythme, « Delayed after depolarization »  |
| DAG               | : Diacylglycérol   |
| E                 | : Épinéphrine  |
| EAD               | : Trouble du rythme, dépolarisation secondaire précoce (Early after depolarization)                                  |
| ECA               | : Enzyme de conversion de l'angiotensine   |
| ECG               | : Électrocardiogramme  |
| EGFR              | : «Epidermal growth factor receptor», ou récepteur du facteur de croissance de l'épiderme                            |
| ELK               | : Facteur de transcription   |
| ER                | : Réticulum endoplasmique  |
| ERG               | : «Ether-à-go-go Related Gene » (sous-unité $\alpha$ du courant I <sub>Kr</sub> ) Aussi, hERG pour l'isoforme humain |
| ERK               | : «extracellular signal-related kinase»  |

|            |  |
|------------|--|
| ET-1       | : Endothéline  |
| FGF        | : Fibroblast growth factor   |
| HDAC       | : Histone déacétylase  |
| $I_{CaL}$  | : Le courant calcique de type L  |
| $I_{CaT}$  | : Le courant calcique de type T  |
| IECA       | : Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine                                     |
| $I_K$      | : Les courants potassiques à rectification retardée  |
| $I_{Kr}$   | : Composante rapide des courants $K^+$ à rectification retardée ( $I_K$ )                    |
| $I_{Ks}$   | : La composante lente des courants $K^+$ à rectification retardée ( $I_K$ )                  |
| $I_{Kur}$  | : Le courant $K^+$ à rectification retardée ultra rapide (« ultra rapid delayed rectifier ») |
| $I_{K1}$   | : Le courant $K^+$ à rectification entrante (« inward rectifier »)                           |
| $I_{ss}$   | : Le courant $K^+$ sortant à l'équilibre (« steady-state »)                                  |
| $I_{to}$   | : Le courant $K^+$ transitoire sortant indépendant du $Ca^{2+}$ (« transient outward »)      |
| $I_{peak}$ | : Le courant $K^+$ total   |
| InsP3      | : voir $IP_3$  |
| $IP_3$     | : Inositol 1,4,5-triphosphate  |
| ISO        | : Isoprotérénol  |
| $K^+$      | : Potassique, potassium  |
| KB         | : Solution Kraft-Brühe   |
| $K_{ir}$   | : Canaux potassiques à rectification entrante  |
| $K_v$      | : Canaux potassiques dépendants du voltage   |
| $K_vLQT1$  | : Sous-unité $\alpha$ du canal responsable du courant $I_{Ks}$                               |
| MAPK       | : Protéine kinase activée par facteur mitogène « Mitogen-activated protein kinase »          |
| MinK       | : « minimal $K^+$ channel », sous-unité $\beta$ du courant $I_{Ks}$                          |
| MirP-1     | : « minimal $K^+$ channel related gene », sous-unité $\beta$ du courant $I_{Kr}$             |
| mM         | : Millimolaire   |
| ms         | : Milliseconde   |
| mV         | : Millivolt  |
| $Na^+$     | : Sodique, sodium  |
| NCX        | : Échangeur sodium-calcium   |
| NE         | : Norépinephrine   |
| PA         | : Potentiel d'action   |
| PIP2       | : Phosphatidyl inositol bisphosphate   |
| PI3K       | : Phosphatidylinositol 3-kinase  |
| pF         | : Picofarade   |
| PKA        | : Protéine kinase A  |
| PKC        | : Protéine kinase C  |
| PLA        | : Phospholipase A  |
| PLC        | : Phospholipase C  |

|              |   |
|--------------|---|
| PLD          | : Phospholipase D   |
| QT           | : Intervalle QT   |
| QTc          | : Intervalle QT corrigé en fonction du rythme cardiaque               |
| Rac          | : Sous famille de protéine Rho (qui sont des petites protéine G)      |
| Raf-1        | : MAPK, activée par voie des RAS                                      |
| Ras          | : Superfamille de petites protéine G, comprend plusieurs sousfamilles |
| RhoA         | : Petite protéine G, membre de la superfamille des RAS                |
| RyR          | : Récepteur de la ryanodine   |
| SERCA        | : Pompe calcium ATPase du reticulum sarcoplasmique                    |
| SHR(rat)     | : Lignée de rats spontanément hypertendus                             |
| SNS          | : Système nerveux sympathique   |
| SR           | : Réticulum sarcoplasmique  |
| SRAA         | : Système rénine-angiotensine-aldostérone                             |
| TGF- $\beta$ | : Transforming growth factor- $\beta$                                 |
| $\mu$ M      | : Micromolaire  |
| WT           | : Souris de type sauvage (« Wild-type »)                              |
| 4-AP         | : 4-aminopyridine   |

*À Denis, « mon petit papa préféré »*  
*Je sais que tu continues de veiller sur moi...*

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier ma directrice de recherche, le Dr Céline Fiset. Son grand savoir, sa grande disponibilité, sa rigueur, son sens du détail et son excellent esprit formateur m'ont permis de cheminer sur le plan scientifique et personnel. Les quelques années passées dans son laboratoire auront une influence certaine dans ma vie et sur ma future carrière.

Les projets de recherche auxquels j'ai participé n'auraient pas été possibles sans la participation de nos collaborateurs. Merci aux Drs Mona Nemer et Pierre Paradis de nous avoir permis d'étudier la souris AT1R et de nous avoir aidés à l'acquisition et à l'interprétation de nos données. Merci au Dr Hans Rindt, à Véronique Trépanier-Boulay et à Frédéric Mercier pour avoir travaillé avant moi et avec moi sur le projet  $\alpha_{1B}$ -AR.

Merci à toutes les personnes que j'ai eu la chance de côtoyer à l'Institut de cardiologie de Montréal et à l'Université de Montréal et avec lesquelles j'ai travaillé, appris et discuté de science ou de la vie. Plus particulièrement, merci à mes collègues du laboratoire Marie-Andrée, Gracia, Scott, Catherine, Sophie et Annie qui ont participé activement à mon doctorat par leur aide, leur soutien et leur enrichissement personnel. Merci aussi à Marc-Antoine. G., Louis V., Maya. M. et à Manon L. pour leur soutien, leurs conseils et l'aide apportée pour résoudre nos petits et grands problèmes.

Merci à ma famille, mon frère Marc-André et ma mère Lisette qui sont loin, mais qui ont toujours été là pour voir mes progrès et me soutenir lors des moments plus difficiles. Finalement, un immense merci à mon conjoint David Tardif. Les dernières années n'ont pas toujours été faciles. Il y a eu de grandes joies, des bons et des moins bons coups et des moments pas mal difficiles. Ton soutien a souvent fait toute la différence et je suis vraiment reconnaissante pour tout ce que tu as fait. Merci à mon petit Noah, qui est un réel rayon de soleil dans ma vie. Je vous adore.



# Chapitre 1 : Introduction

Les maladies cardiovasculaires représentent l'une des causes principales de décès au niveau mondial. Ces maladies ont des répercussions importantes sur les personnes atteintes et leurs proches (mauvaise santé, limitation des activités quotidiennes, anxiété et dépression) ainsi que sur la société (système de santé engorgé, coût économique). Les mauvaises habitudes de vie associées avec l'épidémie d'obésité ainsi que le vieillissement de la population augmentent la prévalence des maladies cardiovasculaires et feront décupler les impacts individuels et collectifs de ces maladies.

Parmi les maladies cardiaques les plus fréquentes, il y a les cardiomyopathies qui sont une atteinte du muscle cardiaque qui affecte la structure et la fonction du cœur. Le remodelage cardiaque qui se produit lors de cardiomyopathies est défini par des modifications des propriétés intrinsèques des cellules cardiaques qui entraînent des changements de l'état structurel, fonctionnel ou électrique au niveau cellulaire et/ou tissulaire du cœur. Le remodelage cardiaque entraîne souvent une perte de la fonction cardiaque qui peut se détériorer en insuffisance cardiaque (syndrome où le cœur n'est plus apte à perfuser suffisamment les organes). Malgré la nature «chronique» de ces maladies et la progression de l'atteinte du myocarde vers l'insuffisance cardiaque, plus de 50% des décès des patients atteints d'insuffisance cardiaque surviennent subitement et de façon imprévisible. Le développement de la cardiomyopathie et sa progression vers l'insuffisance cardiaque impliquent divers mécanismes de régulation moléculaires et sont souvent associées avec d'autres troubles cardiaques tels que les arythmies qui peuvent entraîner la mort des patients atteints. Une bonne compréhension de la physiologie cardiaque et de la pathophysiologie de troubles cardiovasculaires tels que les cardiomyopathies permettrait d'établir la cause réelle de la survenue d'arythmies lors du remodelage et optimiserait le choix des traitements pharmacologiques offerts aux patients.

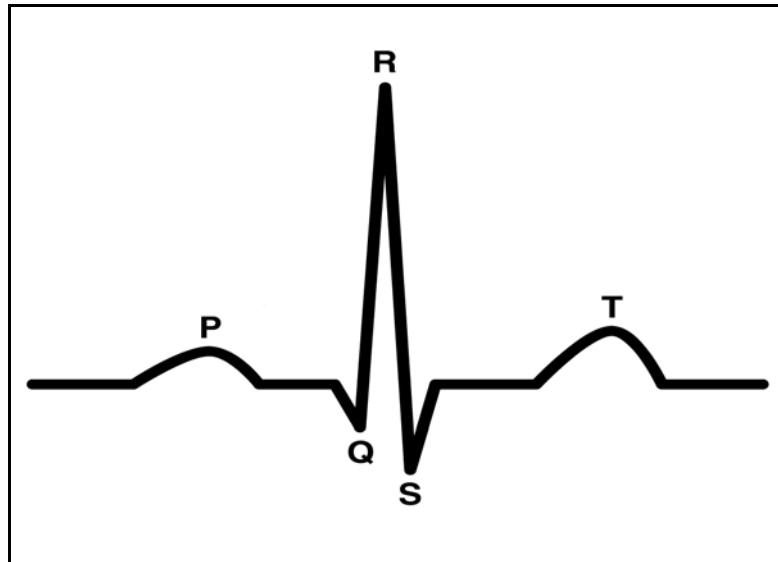
## **1.1 Physiologie cardiaque**

### **1.1.1 Les paramètres de l'excitabilité cardiaque**

Le cœur bat normalement à un rythme constant qui lui permet de faire circuler le sang dans tout l'organisme. Chacun des battements est produit par la propagation d'une onde d'excitation, le potentiel d'action, partant de l'oreillette droite vers les ventricules. L'onde de dépolarisation, initiée au nœud sinusal, se propage ainsi dans le système de conduction vers les ventricules en passant par le nœud auriculo-ventriculaire, les faisceaux de His et les fibres de Purkinje pour dépolariser l'ensemble des cardiomyocytes et permettre la contraction cellulaire et ainsi, la contraction globale du cœur.<sup>1,2</sup>

#### **1.1.1.1 L'électrocardiogramme**

Il est possible d'étudier la propagation de l'onde d'excitation dans le cœur par l'enregistrement d'un électrocardiogramme (ECG). L'ECG est la représentation des variations électriques produites par la dépolarisation et la repolarisation cellulaires dans les différentes régions du cœur. Sur l'enregistrement d'ECG, on retrouve les ondes P, Q, R, S et T qui reflètent la propagation de l'onde d'excitation, soit la dépolarisation et la repolarisation des différentes régions du cœur. (Figure 1.1) La mesure des ondes et de l'intervalle de temps entre deux ondes fournit des informations sur l'excitabilité cardiaque et sur la vitesse de propagation de cette onde d'excitation ou sur la conduction. Sur un tracé d'ECG, l'onde P correspond à la dépolarisation des oreillettes, le complexe QRS représente la dépolarisation des ventricules (et camoufle la repolarisation des oreillettes) et finalement, l'onde T correspond à la repolarisation des ventricules.



**Figure 1.1 Schématisation d'un électrocardiogramme normal**

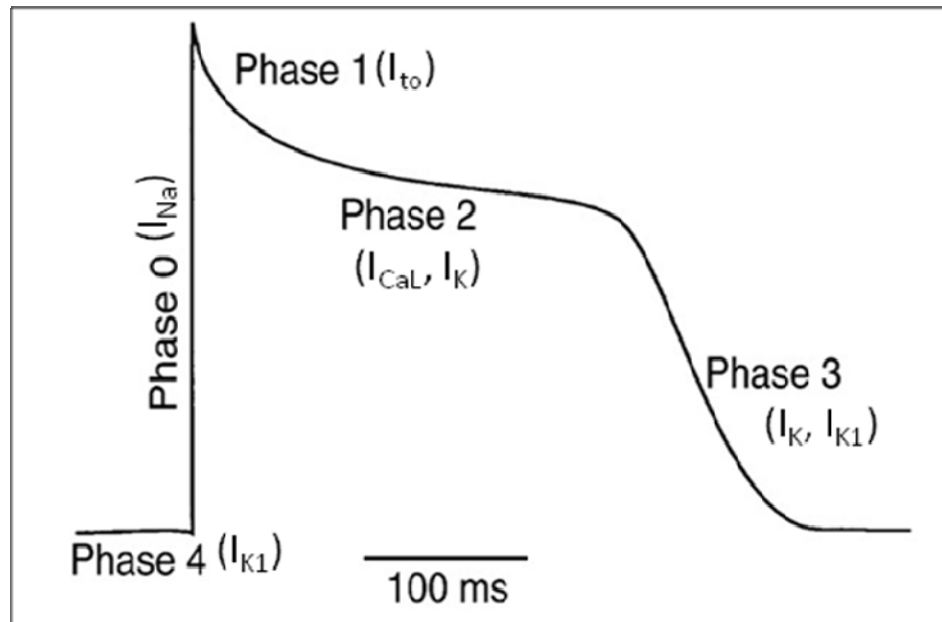
(<http://www.vanth.org/vibes/electro.html>) P = onde P qui représente la dépolarisation des oreillettes, Q = onde Q, R = onde R, S = onde S, le complexe QRS représente la dépolarisation des ventricules et T = onde T qui correspond à la repolarisation des ventricules.

En mesurant la durée des différentes ondes ou l'intervalle de temps entre celles-ci, il est possible d'évaluer la vitesse de propagation de l'onde d'excitation et de déceler des troubles d'excitation ou de conduction. Par exemple, l'intervalle PR (allant du début de l'onde P jusqu'au début de l'onde Q) correspond à la dépolarisation des oreillettes et à la propagation de l'onde d'excitation vers les ventricules. Cette donnée nous permet de mesurer la vitesse de conduction des oreillettes vers les ventricules. D'un autre côté, la repolarisation des ventricules est étudiée par la mesure de l'intervalle QT (allant du début de l'onde Q jusqu'à la fin de l'onde T).<sup>2-5</sup>

#### **1.1.1.2 Le potentiel d'action cellulaire**

Pour permettre la contraction globale du cœur, chacun des cardiomyocytes des oreillettes et des ventricules doit se dépolariser et se repolariser pour se contracter. Le potentiel d'action (PA) représente la dépolarisation suivi de la repolarisation de la cellule.

Au repos, la membrane des cardiomyocytes est polarisée, c'est-à-dire que les charges ne sont pas réparties de façon équivalente des deux côtés de la membrane. Le potentiel de membrane au repos des cardiomyocytes est autour de -80 mV, c'est-à-dire qu'elle est chargée négativement à l'intérieur.<sup>6</sup> Au cours du potentiel d'action, différents courants ioniques membranaires s'activent et s'inactivent pour faire entrer ou sortir des ions de la cellule. Ces courants sont dépendants du voltage et laissent passer spécifiquement les ions selon le gradient de concentration de l'ion. Le potentiel d'action se produit en cinq phases distinctes (0 à 4) qui dépendent de ces courants ioniques. (Figure 1.2)

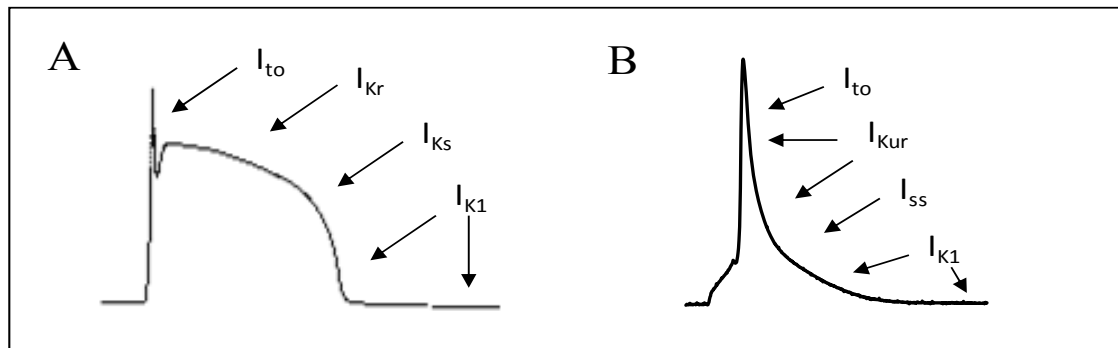


**Figure 1.2 Schématisation d'un potentiel d'action d'un cardiomyocyte ventriculaire d'humain (Adaptée de <sup>3</sup>).** Les cinq phases du potentiel d'action ventriculaire sont (0) la dépolarisation induite par le courant  $Na^+$  entrant ( $I_{Na}$ ), (1) la repolarisation rapide produite par l'inactivation du courant  $Na^+$  et l'activation du courant  $K^+$  transitoire sortant indépendant du  $Ca^{2+}$  ( $I_{to}$ ), (2 ou plateau) la phase d'équilibre entre le courant  $Ca^{2+}$  entrant ( $I_{CaL}$ ) et le courant  $K^+$  à rectification retardée ( $I_K$ ), (3) la repolarisation produite par le  $I_K$  et le courant  $K^+$  à rectification entrante  $I_{K1}$  et (4) la retour au repos et le maintien du potentiel de membrane au repos jusqu'au prochain potentiel d'action.

Brièvement, la phase 0 correspond à l'activation du courant sodique ( $I_{Na}$ ) qui fait entrer rapidement le  $Na^+$  dans la cellule pour dépolariser la membrane. Par la suite, le courant  $Na^+$  s'inactive et le courant  $K^+$  transitoire sortant ainsi que le courant  $Ca^{2+}$  entrant s'activent. Le courant  $K^+$  transitoire sortant s'active et s'inactive rapidement pour former la phase 1 (ou phase rapide de repolarisation) du potentiel d'action. La phase 2 ou plateau du potentiel d'action est produite par l'équilibre entre le courant  $Ca^{2+}$  de type L ( $I_{CaL}$ ) entrant et le courants  $K^+$  sortants. Le plateau est une phase de faible conductance où une petite variation dans la densité des courants ioniques peut affecter l'équilibre et jouer sur la durée du potentiel d'action. L'inactivation de  $I_{CaL}$  permet ensuite aux courants  $K^+$  de repolariser la cellule en ramenant le potentiel de membrane au repos (phase 3).<sup>7</sup> Le courant  $K^+$  à rectification entrante  $I_{K1}$  participe à la fin de la repolarisation ainsi qu'au maintien stable du potentiel de membrane au repos jusqu'à l'initiation du prochain potentiel d'action (phase 4).<sup>1,6</sup>

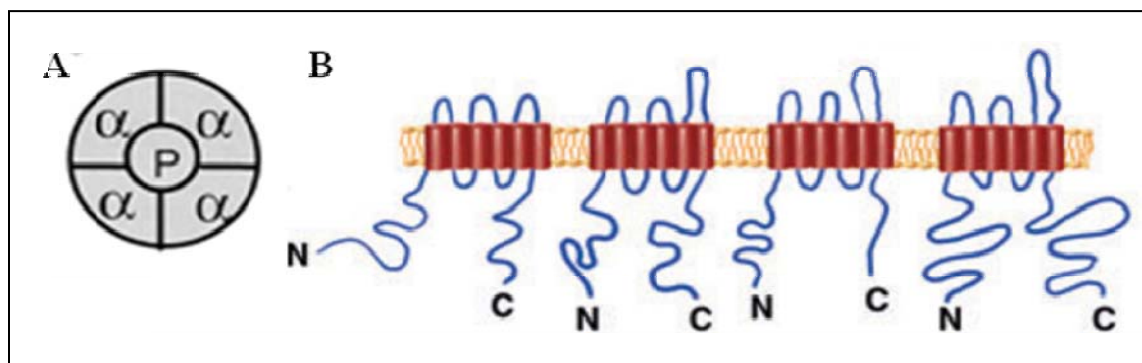
### 1.1.1.3 Les courants potassiques ventriculaires

Au niveau des cardiomyocytes ventriculaires, deux grands types de courants  $K^+$  sortants ont été identifiés et caractérisés soient le courant  $K^+$  transitoire sortant indépendant du  $Ca^{2+}$  ( $I_{to}$ , pour « transient outward ») et le courant  $K^+$  à rectification retardée ( $I_K$ , ou « delayed rectifier »). Un troisième courant potassique est aussi présent dans les cardiomyocytes ventriculaires soit le courant  $K^+$  à rectification entrante,  $I_{K1}$ . Chacun de ces courants possède des propriétés d'activation et d'inactivation ainsi qu'une dépendance au voltage différentes qui déterminent son implication au cours du potentiel d'action<sup>8</sup> (Figure 1.3). La densité des différents courants et des canaux  $K^+$  responsables de ces courants ioniques varie selon l'espèce, l'âge et la région du cœur.<sup>8-11</sup> De plus, les courants  $K^+$  peuvent être régulés par des facteurs hormonaux et neurohormonaux ainsi que dans plusieurs conditions pathologiques.<sup>1,8</sup>



**Figure 1.3** Les courants  $K^+$  activés au cours du potentiel d'action des cellules ventriculaires d'humain (A) et de souris (B) (adapté de <sup>12</sup> et données expérimentales)

Les canaux potassiques dépendants du voltage, les  $K_v$ , sont responsables des courants potassiques sortants  $I_{to}$  et  $I_K$ . Ils sont composés de quatre protéines distinctes, ou quatre sous-unités  $\alpha$  qui s'assemblent pour former le pore sélectif aux ions  $K^+$  (Figure 1.4 A). Chaque sous-unité  $\alpha$  des canaux  $K_v$  est composée de six segments transmembranaires (Figure 1.4 B). Les sous-unités  $\alpha$  s'associent avec des protéines accessoires, les sous-unités  $\beta$  qui ne forment pas le canal mais qui régulent plutôt les propriétés cinétiques de celui-ci et l'expression de la sous-unité  $\alpha$  à la membrane cellulaire.



**Figure 1.4** Structure des canaux  $K^+$  (Adaptée de <sup>11</sup> et <sup>13</sup>). (A) Les quatre sous-unités  $\alpha$  du canal s'associent pour former le pore (B) Chacune des sous-unités  $\alpha$  des canaux  $K^+$  est composée de six segments transmembranaires.

### 1.1.1.3a Le courant $K^+$ transitoire sortant indépendant du $Ca^{2+}$ , $I_{to}$

Le courant  $K^+$  transitoire sortant indépendant du  $Ca^{2+}$ ,  $I_{to}$  s'active et s'inactive rapidement. Il est spécifique aux ions  $K^+$  et il n'est pas sensible aux variations de concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Les canaux  $K^+$  de type Kv4.X et Kv1.4 sont responsables du courant  $I_{to}$ . La composition moléculaire de ce courant est variable selon les espèces, par exemple, chez l'homme et le chien,  $I_{to}$  est composé de Kv4.3, alors que chez la souris et le rat ce courant est formé de deux types de sous-unités, Kv4.2 et Kv4.3.<sup>4,8,14,15</sup> Chez les mammifères de moyenne à grande taille, comme les humains,  $I_{to}$  est responsable de la phase rapide de repolarisation du potentiel d'action et une variation de densité de ce courant transitoire a un effet direct sur la durée de la phase plateau.<sup>7</sup> Chez les espèces plus petites comme les souris, où le rythme cardiaque normal est de plus de 600 battements par minute,  $I_{to}$  joue un rôle important dans la phase majeure de repolarisation.  $I_{to}$  peut être bloqué de façon pharmacologique par le 4-aminopyridine (4-AP) à des concentrations de l'ordre du mM. Les facteurs neurohormonaux, tels qu'une stimulation du récepteur  $\alpha$ -adrénergique ou l'hormone thyroïdienne peuvent réguler  $I_{to}$ .<sup>7</sup>

### 1.1.1.3b Le courant $K^+$ à rectification sortante retardée, $I_K$

Le courant  $K^+$  à rectification sortante retardée,  $I_K$ , s'active et s'inactive plus lentement que  $I_{to}$ . Ce courant est surtout présent dans les phases 2 et 3 du potentiel d'action et forme le principal courant de repolarisation chez les espèces de moyenne à grande taille. Au niveau des ventricules, plusieurs composantes forment ce courant  $K^+$ . Chez l'homme, on retrouve  $I_{Kr}$  (la composante rapide) et  $I_{Ks}$  (la composante lente).<sup>1,8</sup>  $I_{Kr}$  s'active plus rapidement et à des voltages plus négatifs que  $I_{Ks}$ . Les sous-unités protéiques  $\alpha$  et  $\beta$ , ERG (pour « Ether-a-gogo related gene » ou Kv11.1 produit par le gène KCNH1) et MirP1 (pour « minimal  $K^+$  channel related peptide », produit par le gène KCNE2) interagissent ensemble et leur association est responsable du courant  $I_{Kr}$ . D'un autre côté, le courant  $I_{Ks}$  est formé par KvLQT1 (ou Kv7.1, produit par KCNQ1) et minK (pour « minimal  $K^+$

channel » produit du gène KCNE1).<sup>3,4,8,16</sup> Le courant  $I_K$  chez la souris est, comme chez l'homme, composé de deux éléments distincts soit le courant  $K^+$  à rectification retardée ultrarapide,  $I_{Kur}$  et le courant  $K^+$  sortant à l'équilibre,  $I_{ss}$ .  $I_{Kur}$  est un courant de repolarisation important chez la souris puisque son activation est très rapide et son inactivation est lente, ce qui lui permet d'être activé sur une longue période au cours du potentiel d'action. Il est très sensible à de faibles concentrations de 4-AP (dans l'ordre du  $\mu M$ ).  $I_{Kur}$  est formé par le canal Kv1.5.<sup>4,17</sup>  $I_{ss}$  s'active lentement et s'inactive très peu. Il est formé du canal Kv2.1 et il est insensible au 4-AP. Ces différentes propriétés permettent de séparer les deux composantes du courant  $I_K$  chez la souris à l'aide de protocoles d'électrophysiologie.<sup>4,18</sup> L'implication physiologique du courant  $I_{ss}$  est moindre chez la souris, comparativement au courant  $I_{to}$  et  $I_{Kur}$ , à cause de son amplitude plus faible et de sa cinétique d'activation plus lente.<sup>18</sup>

#### *1.1.1.3c Le courant $K^+$ à rectification entrante, $I_{K1}$*

Contrairement aux courants  $I_{to}$  et  $I_K$ , le courant à rectification entrante,  $I_{K1}$  possède une composante entrante de courant  $K^+$ .  $I_{K1}$  joue un rôle important dans le contrôle de l'excitabilité cardiaque en contribuant à la fin de la repolarisation (via la portion sortante du courant) ainsi qu'au maintien du potentiel de repos membranaire. La base moléculaire du canal responsable de  $I_{K1}$  est Kir2.X, dont le principal est Kir2.1.<sup>1,4,8</sup> Comme pour les canaux Kv, le canal Kir est formé de quatre sous-unités. Toutefois, chacune de ces sous-unités est composée de seulement deux segments transmembranaires.<sup>1</sup>

#### **1.1.1.4 Les courants calciques ventriculaires**

Contrairement aux courants  $K^+$ , il existe peu de diversité dans les courants  $Ca^{2+}$  retrouvés au niveau cardiaque. Les courants calciques sont impliqués dans la régulation de l'excitabilité électrique (au cours de la phase 2) du potentiel d'action et dans la contraction cellulaire.



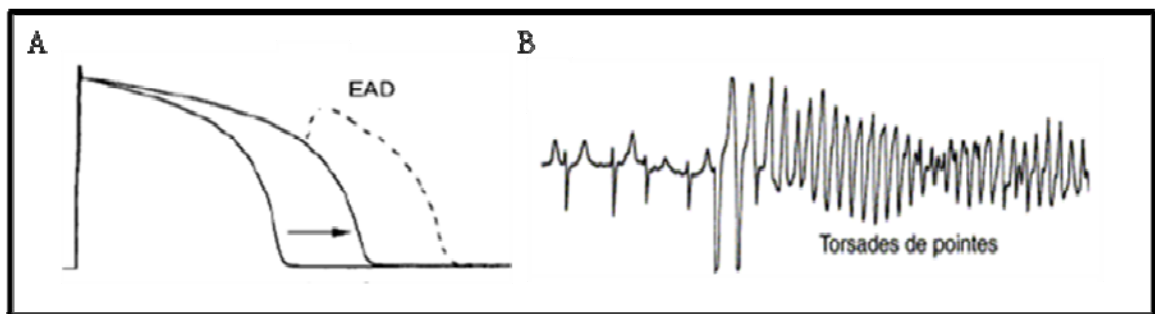
Au niveau cardiaque, on retrouve de façon ubiquitaire chez les mammifères adultes le courant  $\text{Ca}^{2+}$  de type L ( $I_{\text{CaL}}$ ).<sup>1</sup> En conditions normales,  $I_{\text{CaL}}$  est la principale source d'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur de la cellule. Cette entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  participe au contrôle de l'excitabilité cardiaque (phase plateau du potentiel d'action) et initie la relâche massive du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol à partir du réticulum sarcoplasmique. Ce phénomène, communément appelé «  $\text{Ca}^{2+}$  induces -  $\text{Ca}^{2+}$  released, *CICR* », permet ensuite au calcium cytosolique de lier les myofilaments pour produire la contraction cellulaire. Les canaux  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Ca}_v1.2$  forment le courant  $I_{\text{CaL}}$  au niveau ventriculaire.  $I_{\text{CaL}}$  joue un rôle dans la repolarisation puisque sa fermeture brise l'équilibre de la phase plateau du potentiel d'action et permet aux courants  $\text{K}^+$  de repolariser la membrane.

En conditions normales,  $I_{\text{CaL}}$  est le seul courant  $\text{Ca}^{2+}$  présent au niveau des cardiomyocytes ventriculaires chez les mammifères adultes. Toutefois, un autre courant  $\text{Ca}^{2+}$ , le courant  $\text{Ca}^{2+}$  de type T ( $I_{\text{CaT}}$ ) est parfois retrouvé dans certaines conditions au niveau des myocytes. En conditions physiologiques,  $I_{\text{CaT}}$  est présent dans les cellules auriculaires et ventriculaires seulement chez les fœtus et les nouveau-nés et disparaît chez l'adulte. Dans les cœurs de mammifères adultes,  $I_{\text{CaT}}$  se retrouve dans le système de conduction.<sup>19</sup> Il a toutefois été montré qu'en conditions pathologiques,  $I_{\text{CaT}}$  peut être réexprimé dans les cardiomyocytes et pourrait contribuer au développement de certaines pathologies telles que l'hypertrophie et le remodelage cardiaques.<sup>20,21</sup>

#### **1.1.1.5 Les arythmies cardiaques - rôle des différents courants ioniques**

Les courants ioniques entrant et sortant régulent la dépolarisation et la repolarisation des cardiomyocytes. Des changements dans la densité de ces courants ioniques peuvent ainsi faire varier la durée du potentiel d'action et affecter globalement la conduction ou l'excitabilité des cellules d'une région du cœur. Au niveau des ventricules, la repolarisation est étudiée à partir de la mesure de l'intervalle QTc (QT corrigé selon le rythme cardiaque) de l'ECG. La prolongation ou le raccourcissement de l'intervalle QTc sont associés avec

des troubles de repolarisation ventriculaire. Un retard de repolarisation, causé par une diminution de la densité des courants  $K^+$ , peut entraîner l'initiation d'un second potentiel d'action avant que le premier ne soit terminé. Ce phénomène se nomme des dépolarisations secondaires précoces communément appelées « Early After Depolarisation » (EAD).<sup>4,22</sup> Ces EADs peuvent se produire successivement sur plusieurs potentiels d'action et dégénérer en arythmies telles que les Torsades de Pointe. (Figure 1.5) Les Torsades de pointe sont quant à elles des tachycardies polymorphiques ventriculaires qui sont associées avec des défauts dans le flux ioniques. Ce type d'arythmies peut être héréditaire tels que les syndromes du long QT congénitaux ou acquis par l'administration de médicaments ou par certaines conditions pathologiques comme l'infarctus du myocarde ou le remodelage cardiaque. Finalement, une tachycardie ventriculaire soutenue peut dégénérer en fibrillation ventriculaire qui est une désorganisation totale de l'activité électrique et ne produit plus aucune contraction cardiaque.<sup>23</sup>



**Figure 1.5 Troubles du rythme associés avec un retard de repolarisation**

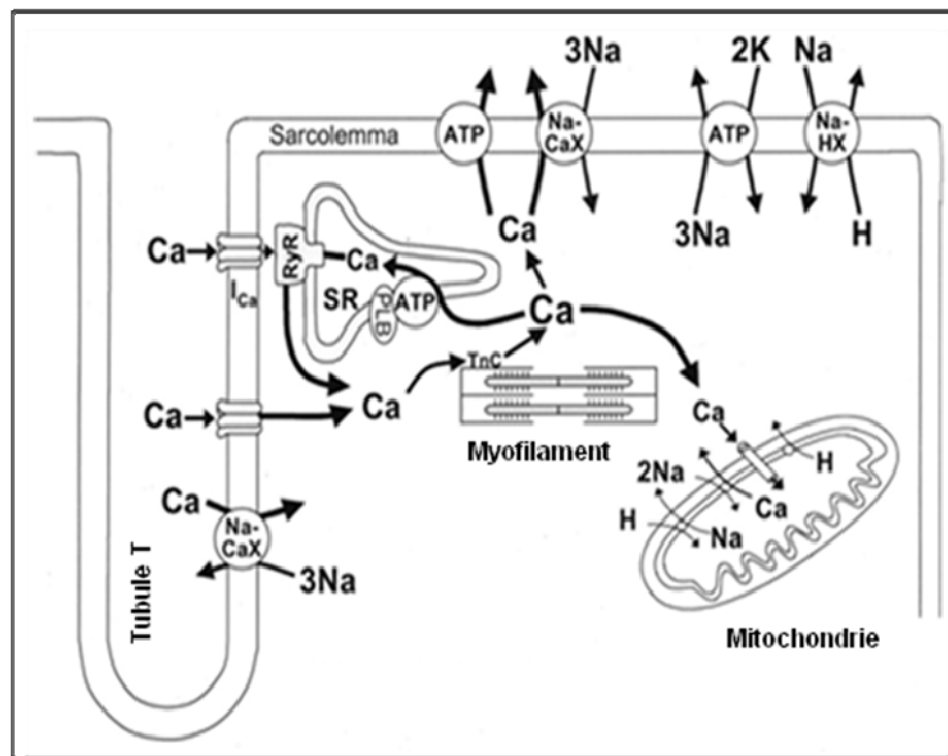
(A) Une dépolarisation secondaire précoce ou EAD pour « Early After Depolarization » (adapté de <sup>4</sup>) (B) Une Torsade de pointe (adapté de <sup>3</sup>).

Malgré que les courants  $K^+$  soient les principaux courants responsables de la repolarisation, des changements dans la densité des courants entrants peuvent aussi modifier la durée du potentiel d'action et affecter l'excitabilité cardiaque. Par exemple, une augmentation de la densité des  $I_{CaL}$ , présent dans la phase plateau du potentiel d'action, peut retarder la repolarisation. Aussi, deux types de syndromes de long QT congénitaux sont associés avec des mutations des gènes des canaux  $Na^+$  (SCN5A, LQT3) ou des canaux

$\text{Ca}^{2+}$  (CACNA1C, LQT8).<sup>24,25</sup> Ces mutations de type « gain de fonction » augmentent l'entrée de  $\text{Na}^+$  ou de  $\text{Ca}^{2+}$  et causent une prolongation de la durée du potentiel d'action. Ainsi, des variations dans la densité des courants entrants ou sortants (selon la région du cœur, selon l'espèce ou causées par une maladie ou l'administration d'agents pharmacologiques) vont influencer la forme et la durée du potentiel et peuvent alors représenter un risque pour le développement d'arythmies.

### 1.1.2 Les courants ioniques et la contraction cardiaque

Le cœur doit battre régulièrement et efficacement pour permettre un bon débit sanguin et une bonne perfusion des organes. La propagation de l'onde d'excitation dans tout le cœur permet aux cardiomyocytes de se dépolariser pour activer les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendant du voltage et faire entrer le  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cardiomyocytes. Ce  $\text{Ca}^{2+}$  entrant via  $\text{I}_{\text{CaL}}$  active les récepteurs de la ryanodine (RyR) et initie la relâche massive du  $\text{Ca}^{2+}$  entreposé dans le réticulum sarcoplasmique (SR) vers le cytosol. Le  $\text{Ca}^{2+}$  relâché pourra ensuite lier les myofilaments pour produire la contraction. Le  $\text{Ca}^{2+}$  sera ensuite évacué du cytosol par sa recapture dans le SR via la pompe  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA) et aussi par sa sortie de la cellule via l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) et la pompe  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase de la membrane cellulaire (Figure 1.6).<sup>26,27</sup> Les niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaires sont ainsi contrôlés par plusieurs protéines intracellulaires. L'augmentation rapide suivie de la diminution rapide des concentrations intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  se nomme transient de  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figure 1.6 Régulation de l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (Adaptée de <sup>27</sup>)** Pour permettre la contraction cellulaire, le  $\text{Ca}^{2+}$  entrant dans la cellule via  $\text{I}_{\text{CaL}}$ , active les récepteurs de la ryanodine (RyR) pour produire la relâche massive du  $\text{Ca}^{2+}$  entreposé dans le réticulum sarcoplasmique (SR). Suite à la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  avec les myofilaments pour produire la contraction, le  $\text{Ca}^{2+}$  sera évacué du cytosol par sa recapture dans le SR et sa sortie de la cellule via l'échangeur  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  (NCX) et la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sarcolemmale.

Tous les processus du « couplage excitation-contraction » doivent être synchronisés pour permettre une utilisation optimale du  $\text{Ca}^{2+}$  ainsi que la contraction efficace du muscle cardiaque. La fonction cardiaque est la capacité du cœur à se contracter pour expulser le sang (fonction systolique) ainsi que la capacité de celui-ci à se relaxer pour laisser les différentes chambres cardiaques se remplir de sang (fonction diastolique). Elle est étroitement liée aux paramètres électrophysiologiques et à la régulation des différents courants ioniques impliqués dans le potentiel d'action. Un changement dans la régulation de ces courants ioniques peut donc affecter la fonction cardiaque. Par exemple, une

diminution de  $I_{CaL}$  entraîne une réduction de l'entrée du  $Ca^{2+}$  et affecte la relâche intracellulaire du  $Ca^{2+}$ , essentiel pour produire la contraction. D'un autre côté, la diminution des courants  $K^+$ , plus particulièrement  $I_{to}$  qui influence la durée de la phase plateau, prolonge le temps d'ouverture des canaux  $Ca^{2+}$ . Il pourra alors y avoir plus de  $Ca^{2+}$  qui entrera dans la cellule ce qui peut alors affecter la contraction et d'autres phénomènes dépendant du  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Ainsi, une variation de la densité des courants ioniques peut affecter directement ou indirectement la fonction cardiaque. Des troubles dans la régulation de l'entrée du  $Ca^{2+}$  via les courants  $I_{CaL}$  et dans la régulation des concentrations intracellulaires de  $Ca^{2+}$  (relâche et évacuation du  $Ca^{2+}$ ) peuvent aussi être impliqués dans la survenue d'arythmies comme les DADs (« delayed after depolarization ») qui sont principalement causées par la relâche spontanée de  $Ca^{2+}$  par le SR.<sup>22</sup>

## **1.2 Les cardiomyopathies**

Les cardiomyopathies sont une atteinte du muscle cardiaque qui peut se produire pour diverses raisons. Ces pathologies détériorent la fonction du cœur et peuvent se transformer progressivement en insuffisance cardiaque. En plus d'avoir une fonction cardiaque diminuée, les personnes souffrant de cardiomyopathie sont aussi plus à risque d'avoir d'autres types d'atteintes cardiaques telles que des arythmies et de mourir subitement.<sup>13,28</sup>

### **1.2.1 La classification des cardiomyopathies**

Il existe plusieurs formes de classification des cardiomyopathies. Une des principales façons de classer les cardiomyopathies est selon les causes de la pathologie qui sont (1) primaires (reliées seulement au cœur) ou (2) secondaires (systémiques, métaboliques, nutritionnelles). Toutefois, il est parfois difficile d'établir la cause précise d'une cardiomyopathie, alors cette classification n'est pas la plus couramment utilisée. La classification la plus commune est basée sur les anomalies structurelles et fonctionnelles du myocarde. Les cardiomyopathies sont alors divisées en trois catégories soient les cardiomyopathies (1) restrictives, (2) hypertrophiques et (3) dilatées. Cette classification permet de choisir le bon traitement adapté selon la cause de la maladie et l'atteinte du cœur.<sup>13,28</sup>

#### **1.2.1.1 La cardiomyopathie restrictive**

La cardiomyopathie restrictive se caractérise par un trouble de la fonction diastolique, qui affecte la relaxation du myocarde et le remplissage des différentes chambres du cœur, sans toucher la fonction systolique (contraction). À la longue, la fonction systolique peut aussi se détériorer. Cette forme de cardiomyopathie est la moins

répandue et la moins connue. Elle peut être causée par un autre trouble ou une affection cardiaque comme la fibrose endomyocardiale, des radiations ou un cancer métastatique.<sup>28</sup>

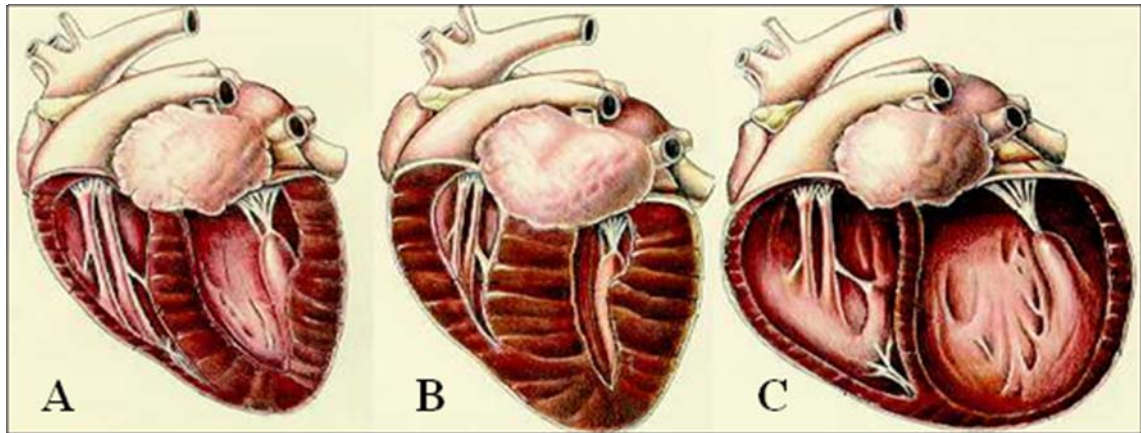
### **1.2.1.2 La cardiomyopathie hypertrophique**

Dans la cardiomyopathie hypertrophique, la masse du ventricule est augmentée mais la cavité ventriculaire n'est pas dilatée. Cette forme de cardiomyopathie est caractérisée par un épaissement plus ou moins important du muscle cardiaque (Figure 1.7B). Des mutations dans les protéines sarcoplasmiques sont souvent responsables de l'apparition de la maladie chez plusieurs patients.<sup>13</sup> La pathophysiologie de la maladie peut varier selon la cause de la maladie, mais quelques signes sont plus couramment retrouvés, comme l'augmentation de la taille du ventricule gauche, la dysfonction diastolique qui est causée par l'épaississement et le durcissement de la paroi ventriculaire et la dysfonction systolique causée par un manque de coordination de la contraction. Au niveau cellulaire, la taille des cardiomyocytes est plus grande mais leur nombre n'est pas nécessairement plus élevé (peu d'hyperplasie).<sup>13,28</sup>

### **1.2.1.3 La cardiomyopathie dilatée**

La cardiomyopathie dilatée est caractérisée par une dilatation de la chambre ventriculaire cardiaque (Figure 1.7C). L'épaisseur de la paroi ventriculaire gauche est normale mais la fonction systolique est très affectée par le relâchement du muscle cardiaque ce qui conduit à une diminution du débit sanguin. Cette forme de cardiomyopathie est associée à des causes d'origine génétique familiale, virale ou immune, toxicité alcoolique ou inconnues. Le faible débit sanguin engendré par le relâchement musculaire peut amener une diminution de la perfusion de certains organes et peut aussi résulter à des embolies qui peuvent être un des premiers signes de cette forme de cardiomyopathie. Un « murmure cardiaque » est aussi perceptible lors de l'oscultation et est causé par la moins bonne fermeture des valves due à la dilatation des chambres. Chez les patients souffrants de cardiomyopathie dilatée, il peut aussi y avoir une augmentation de la

pression sanguine causée par une activation du système sympathique pour tenter de compenser la diminution du débit sanguin.<sup>13,28</sup>



**Figure 1.7 Les cardiomyopathies** (adaptée de <http://www.sphynxabc.org/cardo.htm>)  
Représentation d'un cœur normal (A) et de deux cœurs atteints de cardiomyopathie hypertrophique (B) et dilatée (C).

Normalement, la dilatation des différentes chambres cardiaques représente une des étapes avancées de plusieurs types de remodelage cardiaque. Toutefois, certaines formes de cardiomyopathies dilatées ne sont pas le résultat de la détérioration de la maladie et représentent le phénotype pathologique cardiaque dominant, sans présenter de phase hypertrophique. Des modifications du cytosquelette combinées avec des défauts de la régulation de l'apoptose seraient en cause dans cette forme de cardiomyopathie. Les formes de cardiomyopathie hypertrophique et dilatée sont les deux formes les plus fréquemment retrouvées dans la population.

### 1.2.2 Mécanismes compensatoires aux cardiomyopathies

L'atteinte du myocarde qui peut être causée par à un événement aigu comme un infarctus ou suite à un trouble chronique tel que l'hypertension, va mener à une perte progressive des propriétés contractiles des cardiomyocytes et conduire à une diminution de



la fonction cardiaque. Pour compenser les changements de débit sanguin et tenter de maintenir l'homéostasie générale, une série de changements neurohormonaux seront activés. Ces changements seront principalement l'activation du système nerveux sympathique (SNS) et du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) afin de maintenir le débit sanguin. Dans un premier temps, l'activation du système sympathique augmentera le rythme et la force de contraction cardiaque et modifiera la distribution du volume sanguin. Le SRAA produira quand à lui une vasoconstriction et une augmentation du volume sanguin. Ces deux systèmes stimuleront aussi l'expression de gènes qui participeront au maintien de la fonction cardiaque. D'autres médiateurs de l'inflammation seront aussi recrutés afin de réparer les dommages cellulaires et tissulaires.<sup>7,13</sup> À court terme, tous ces changements permettront de compenser de façon bénéfique la baisse de la fonction cardiaque en maintenant la fonction systolique et la perfusion sanguine des organes vitaux. Toutefois, à long terme, la stimulation soutenue de ces systèmes de compensation va faire progresser la dysfonction cardiaque vers l'insuffisance cardiaque. La production chronique de catécholamines, effecteurs du système sympathique, est considérée comme cardiotoxique et l'augmentation de la charge volumique ainsi que la vasoconstriction (induites le système adrénergique et le SRAA) augmentent le stress mécanique, augmentent la demande en oxygène et causent des dommages cellulaires. La combinaison de l'activation des systèmes SNS et SRAA et du stress mécanique active des cascades de signalisation intracellulaire associées avec le remodelage et l'hypertrophie cardiaque.<sup>7</sup> Ainsi, à long terme, les mécanismes activés afin de maintenir l'homéostasie auront pour effet d'affecter davantage la fonction systolique et diastolique et conduiront progressivement vers l'insuffisance cardiaque et la mort.

### **1.2.2.1 Modifications cellulaires menant à l'hypertrophie et au remodelage**

Au niveau cellulaire, plusieurs changements conduisent à l'apparition du phénotype pathologique. Les premiers processus cellulaires activés au cours de la cardiomyopathie multiplient le nombre d'éléments contractiles fonctionnels et la taille des myocytes

augmente alors que l'organisation cellulaire est préservée. Progressivement, l'organisation intracellulaire se modifie en augmentant le nombre d'éléments contractile et en changeant la structure de ceux-ci et finit par rendre ces éléments dysfonctionnels. Cette réorganisation nécessite des changements dans l'expression de différents gènes associés avec l'hypertrophie et le remodelage cellulaire. Ainsi, plusieurs gènes exprimés normalement au cours du développement physiologique du fœtus sont réexprimés. Ce phénomène est appelé la *réactivation du programme fœtal* et est aussi accompagné d'une diminution de l'expression d'autres gènes normalement exprimés dans les cœurs adultes. Parmi les gènes réexprimés lors de l'hypertrophie pathologique cardiaque il y a la chaîne lourde de myosine  $\beta$ , l'actine  $\alpha$  squelettique, l'ANF (« atrial natriuretic factor »), c-fos, c-myc et Egr-1. On peut également voir une diminution de l'expression de la chaîne lourde de myosine  $\alpha$ .<sup>29-33</sup> Ce profil de *réactivation du programme fœtal* représente un indice du remodelage cardiaque dans différents modèles expérimentaux de cardiomyopathies induites, entre autres, lors d'un infarctus du myocarde, par l'administration d'agents pharmacologiques ou dans des modèles d'animaux transgéniques.<sup>32</sup> Globalement, ces changements dans l'expression des gènes vont modifier graduellement le phénotype cellulaire pour amener une augmentation de la grosseur des cellules, une augmentation du contenu protéique cellulaire, une modification de la structure et un réarrangement des myofilaments.

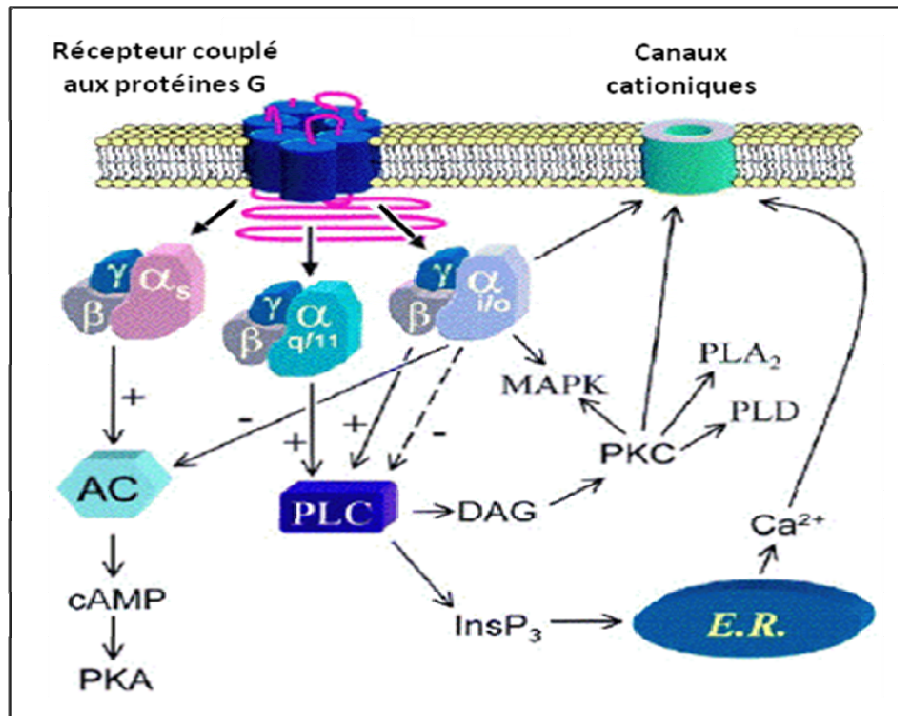
### 1.2.3 Signalisation intracellulaire impliquée dans le remodelage

La reprogrammation de l'expression génique implique l'activation de plusieurs cascades de signalisation intracellulaire associées au développement de l'hypertrophie pathologique. Ces cascades sont interreliées et peuvent jouer un rôle plus ou moins important dans le phénotype pathologique cardiaque observé. Elles régulent l'expression de gènes et l'activité de certaines protéines pour produire le phénotype. Les principaux effecteurs de ces cascades menant au développement de l'hypertrophie sont, entre autres, les protéines G (« GTP-binding protein »), les petites protéines G (RhoA, Ras, Rac), les

« mitogen-activated protein kinase » (MAPK), les protéines kinases C (PKC), la calmoduline et la calcineurine.<sup>34</sup>

### 1.2.3.1 Les protéines G

L'activation des protéines G, particulièrement l'isoforme Gq, est l'une des voies les plus clairement associée avec l'hypertrophie et le remodelage cardiaques. Les protéines G sont des hétérotrimères composés des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Ces protéines sont couplées avec différents récepteurs à sept domaines transmembraires qui une fois activés par la liaison spécifique de leur ligand, vont activer la protéine G. Sous leur forme non-active, les protéines G sont associées avec le GDP. La liaison de l'agoniste au récepteur entraîne un changement de conformation du récepteur qui va permettre la catalyse du GDP en GTP et produire la dissociation de la sous-unité  $\alpha$  et du complexe  $\beta\gamma$ . Les deux sous-unités libérées sont ainsi capables d'aller activer différentes cascades de signalisation.<sup>34</sup> Il existe trois grandes classes de protéines G divisées selon l'action de leur sous-unité  $\alpha$ , soient la  $G_{as}$ , la  $G_{ai}$  et la  $G_{aq}$  (Figure 1.8). Les protéines  $G_{as}$  et  $G_{ai}$  agissent sur l'activité de l'adénylate cyclase (AC) alors que la  $G_{aq}$  agit sur les phospholipases. Une quatrième classe de protéine G a été identifiée soit les protéines de la famille  $G_{12}$ . Ces protéines ne sont toutefois pas encore bien caractérisées et seulement quelques récepteurs et effecteurs ont été associés avec ces protéines. Leurs rôles et leur implication dans la régulation de phénomène physiologique ou dans le développement des troubles cardiaque ne sont pas encore bien définis, mais il semble que l'activation des protéines  $G_{12/13}$  pourrait jouer un rôle dans l'hypertrophie.<sup>35,36</sup>



**Figure 1.8 Schéma de la signalisation intracellulaire associée avec l'activation des protéines G** (Adaptée de <sup>37</sup>) Les trois grands groupes de protéines G agissent en activant l'adénylate cyclase ( $G_{\alpha s}$ ), en inhibant l'adénylate cyclase ( $G_{\alpha i}$ ) ou en activant les phospholypases C (PLC) ( $G_{\alpha q}$ ). Le complexe  $\beta\gamma$  des protéines G peut aussi activer différentes protéines. (voir la listes des abbréviations pour avoir plus de détails)

### 1.2.3.1a L'action des sous-unités $G_{\alpha}$

La  $G_{\alpha s}$  active l'AC pour produire l'AMPc à partir de l'ATP. L'augmentation des niveaux d'AMPc active, entre autres, la protéine kinase A (PKA) qui agit en phosphorylant différentes protéines comme phospholamban (protéine inhibitrice de SERCA) et active ainsi la pompe SERCA. La protéine  $G_{\alpha s}$  n'est pas reconnue pour être directement responsable ou impliquée dans le développement du remodelage cardiaque. La protéine  $G_{\alpha i}$  inhibe l'AC et diminue les niveaux d'AMPc, ce qui produit ainsi l'effet inverse de l'activation de la  $G_{\alpha s}$ . Une augmentation de l'activation de la protéine  $G_{\alpha i}$  associée avec une diminution de l'activité de l'AC a souvent été observée dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaques.<sup>38-41</sup>

D'un autre côté, la sous-unité  $G_{\alpha q}$  active la phospholipase C ( $PLC\beta$ ) qui transforme le phosphatidyl inositol bisphosphate ( $PIP_2$ ) en inositol 1,4,5-triphosphate ( $IP_3$ ) et en diacylglycérol (DAG). D'un côté, l' $IP_3$  induit la relâche du  $Ca^{2+}$  intracellulaire, alors que le DAG active la protéine kinase C (PKC), qui à son tour agit en phosphorylant différentes protéines. Plusieurs évidences ont montré le rôle important des protéines  $G_{\alpha q}$  dans le développement de l'hypertrophie et du remodelage cardiaque. Les principaux récepteurs couplés à ces cascades d'activation qui sont reconnus pour induire l'hypertrophie sont les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques (liant la norépinéphrine), le récepteur de type 1 de l'angiotensine II et le récepteur à l'endothéline.<sup>34,42-44</sup> Certaines études ont confirmé le rôle de l'activation de  $G_q$  dans l'hypertrophie en utilisant la souris transgénique surexprimant  $G_q$  qui présente un phénotype d'hypertrophie cardiaque comparable à l'hypertrophie induite lors de l'hypertension ainsi qu'un profil typique de réexpression fœtale.<sup>32,45</sup> De plus, l'inhibition de  $G_{\alpha q}$  à l'aide d'un anticorps spécifique prévient le développement de l'hypertrophie.<sup>46</sup> Ces données montrent que les cascades de signalisation induites par  $G_{\alpha q}$  sont suffisantes et/ou nécessaires pour produire l'hypertrophie. L'activation de  $G_{\alpha q}$  semble aussi être impliquée dans la progression de la cardiomyopathie vers la dysfonction cardiaque puisque des souris de type sauvage ayant subi une ligature de l'aorte présentent une hypertrophie compensatoire, alors que les souris surexprimant  $G_{\alpha q}$  ayant subi la même intervention développent plutôt de l'hypertrophie associée avec une diminution de leur fonction cardiaque.<sup>47</sup> Il a aussi été montré que l'activation à court terme de  $G_{\alpha q}$  produit de l'hypertrophie alors qu'à plus long terme elle active les voies de l'apoptose (les kinases p38 et JNK) et conduit vers la décompensation de la fonction cardiaque.<sup>45</sup> L'ensemble de ces études montre que l'activation de  $G_{\alpha q}$ , comme première étape de l'activation des cascades de signalisation intracellulaire, est suffisante pour produire le phénotype d'hypertrophie et faire la transition de l'hypertrophie compensée vers l'insuffisance cardiaque.

### *1.2.3.1b L'action des sous-unités $G\beta\gamma$*

Le complexe  $\beta\gamma$  des protéines G est aussi activé par la liaison des ligands aux récepteurs couplés aux protéines G et peut lui aussi réguler différentes voies de signalisation intracellulaire. Par exemple,  $G\beta\gamma$  active des kinases telles que ERK, PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), Ras et Raf-1.<sup>48,49</sup> Ces kinases agissent ensuite en phosphorylant et en activant d'autres protéines, des enzymes et des facteurs de transcription impliqués dans la croissance et la prolifération cellulaire.

### **1.2.3.2 Les autres protéines impliquées dans le remodelage cardiaque**

En plus des protéines G qui sont parmi les principaux inducteurs des cascades de signalisation associées avec le remodelage cardiaque, plusieurs autres protéines et effecteurs jouent un rôle important dans la transduction du message intracellulaire menant au développement de la cardiomyopathie.

#### *1.2.3.2a Les protéines kinases C*

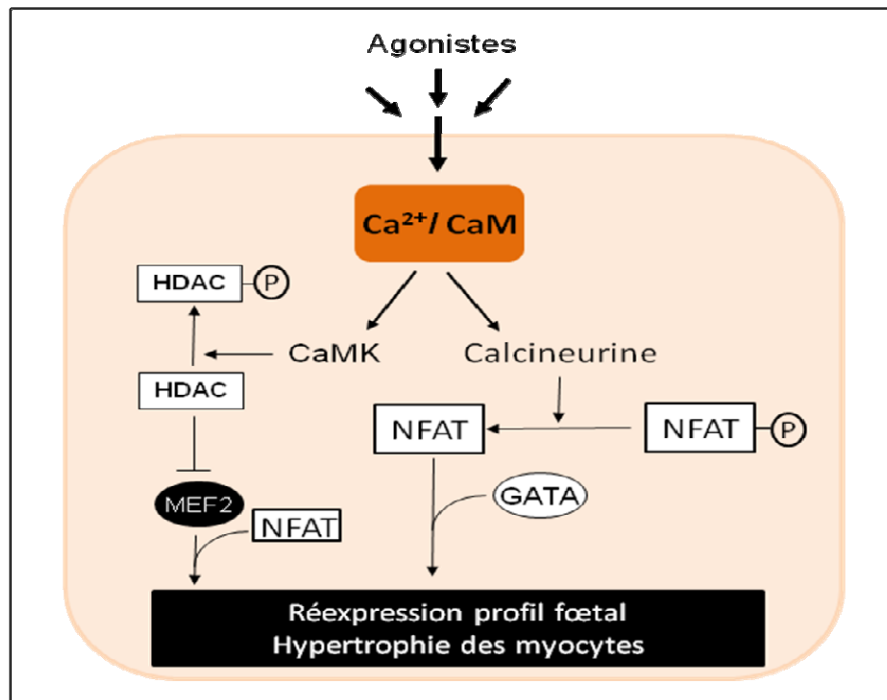
Les protéines kinases C (PKC), activées par DAG, font partie des voies de signalisation activées par les protéines Gq et jouent un rôle dans le développement de la pathologie. Il existe 12 isoformes différents de PKC et leur expression diffèrent selon le tissu, l'espèce ou le stade du développement. Au niveau cardiaque, on retrouve principalement quatre formes soient PKC- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\delta$  et - $\epsilon$ .<sup>50</sup> Lorsqu'elles sont activées, les PKC transloquent vers différents sites d'action dans la cellule. Par exemple, l'activation des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques induit la translocation de PKC $\beta$ I du cytosol vers le noyau, de PKC $\beta$ II de la structure fibrillaire vers la zone périnucléaire et la membrane cellulaire, PKC $\epsilon$  du noyau et du cytosol vers les myofibrilles et PKC $\delta$  vers la région périnucléaire. Les PKC agissent en phosphorylant différentes protéines et leur rôle est déterminé selon leur localisation et leur spécificité à phosphoryler certaines protéines.<sup>34</sup> Les PKC peuvent entre autres réguler les canaux ioniques ( $K^+$ ,  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$ ), la contractilité cardiaque via la

phosphorylation des myofilaments et l'hypertrophie via l'activation de l'expression de gènes.

#### *1.2.3.2b Les protéines dépendantes du $\text{Ca}^{2+}$*

Le  $\text{Ca}^{2+}$  joue aussi un rôle important dans le remodelage cardiaque en régulant plusieurs voies de signalisation via les protéines dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ . Ainsi, des changements dans la régulation des concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  peuvent mener au remodelage cardiaque. La calmoduline (CaM) lie le  $\text{Ca}^{2+}$  et agit comme second messenger pour réguler l'activité de plusieurs protéines dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  telles que la CaMKII («  $\text{Ca}^{2+}$  / CaM dependent protein kinase II » ou la protéine kinase dépendante de  $\text{Ca}^{2+}$  / CaM II) et la calcineurine (Figure 1.9). CaM joue ainsi un rôle central dans l'activation de protéines impliquées dans l'hypertrophie et le remodelage cardiaque. Une étude a montré que la surexpression de la CaM conduit à l'hypertrophie et à l'hyperplasie cellulaire (augmentation de la taille et du nombre de cellules), ce qui confirme le rôle important de cette protéine dans le remodelage.<sup>51</sup> De plus, l'activation de CaM conduit à la phosphorylation de MAPK, tels que JNK et p38 qui sont associées avec le remodelage.<sup>45,52,53</sup> La CaMKII, une protéine kinase activée par  $\text{Ca}^{2+}$  / CaM, peut produire ses effets de deux différentes façons, soient en phosphorylant certaines protéines pour réguler directement leur activité (par exemple SERCA) ou en activant des facteurs de transcription (tel que MEF2) pour augmenter l'expression d'autres protéines.<sup>54</sup> D'un autre côté, la calcineurine est une phosphatase. Elle agit, entre autre, en déphosphorylant le facteur de transcription NFAT (« Nuclear Factor of Activated T cell » ou Facteur nucléaire des lymphocytes T activés) qui est aussi associé avec le remodelage.<sup>55</sup> La surexpression de la calcineurine produit une hypertrophie sévère<sup>55</sup> alors que son inhibition dans différents modèles de cardiomyopathies diminue la dilatation et l'hypertrophie cardiaque.<sup>56</sup> De plus, la cyclosporine A, inhibiteur de la calcineurine, empêche le remodelage cardiaque causé par l'endothéline, l'angiotensine II ou la phényléphrine.<sup>54</sup> Ainsi, les changements dans les

concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  peuvent influencer l'activité de protéines associées avec l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque.



**Figure 1.9 Activation des protéines dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  associées avec le développement de l'hypertrophie.** (Adaptée de <sup>54</sup>) La CaMK II (kinase) et la calcineurine (phosphatase) sont toutes les deux dépendantes des niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaires.

#### 1.2.3.2c Autres protéines associées avec le remodelage cardiaque

D'autres protéines sont aussi impliquées dans le remodelage. Parmi celles-ci, il y a les petites protéines G (« low-molecular-weight GTPase ») telles que Ras, RhoA ou Rac-1. L'activation et la surexpression de Ras produisent de l'hypertrophie et une augmentation de l'expression de c-fos et de l'ANF.<sup>57</sup> La sous-unité  $G_{\beta\gamma}$ , le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire ainsi que d'autres protéines peuvent réguler Ras qui agit sur différentes MAPK telles que ERK1/2, JNK et p38. Ces MAPK sont les kinases terminales de plusieurs voies de signalisation. Elles vont activer des facteurs de transcription et induire l'expression de gènes comme l'ANF qui fait partie des gènes réexprimés au cours de l'hypertrophie.<sup>53</sup>



Plusieurs autres protéines et voies de signalisation peuvent être impliquées dans l'hypertrophie et le remodelage cardiaque, comme l'activateur du signal gp-130, la voie du récepteur « insulin-like growth factor 1 », les « fibroblast growth factor (FGF) et la voie du « transforming growth factor- $\beta$  » (TGF- $\beta$ ). Ces voies de signalisation mènent souvent à l'activation de protéines qui ont été discutées précédemment (Pour un résumé, voir <sup>34</sup>). Il est important de se souvenir que les voies de signalisation intracellulaires induites par les différents stimuli neurohumoraux ou mécaniques sont complexes et sont souvent inter-reliées. La signalisation intracellulaire menant à l'hypertrophie et au remodelage n'est pas une voie purement linéaire et plusieurs facteurs peuvent influencer cette signalisation pour créer le profil pathologique de la cardiomyopathie associé avec un stimulus donné.

#### **1.2.4 Les stimuli produisant le remodelage cardiaque**

Plusieurs stimuli tels que les hormones peptidiques, les facteurs de croissance et les cytokines peuvent mener à l'hypertrophie en activant les cascades de signalisation mentionnées dans les sections précédentes. Les principaux stimuli conduisant à l'hypertrophie et au remodelage cardiaque sont la stimulation du récepteur  $\alpha$ -adrénergique (SNS) par la norépinéphrine, l'angiotensine II (Ang II) et l'endothéline (Et-1). Plusieurs études et plusieurs évidences ont confirmées le rôle de ces neurohormones dans le développement du remodelage et de l'insuffisance cardiaques.

Tout d'abord, l'Ang II, l'endothéline et la stimulation adrénérergique sont reconnues pour être capable d'induire le profil d'expression fœtale.<sup>58-62</sup> Dans des cellules de rats nouveau-nés en culture, l'Ang II, l'Et-1 et l'activation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergique induisent le remodelage et l'hypertrophie au niveau cellulaire.<sup>58,59,62-64</sup> Les principaux récepteurs capables d'activer la cascade des protéines G $\alpha_q$  sont les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques ( $\alpha_1$ -AR), le récepteur de type 1 de l'Ang II (AT1) et le récepteur de l'endothéline.<sup>50</sup> Au niveau cardiaque, les récepteurs couplés à la protéine G $\alpha_q$ , sont capables d'induire l'hypertrophie et le remodelage cardiaque. Les récepteurs  $\alpha_1$ -AR ainsi

que le récepteur AT1 (médiateur des effets de l'Ang II au niveau cardiaque) activent, via la protéine Gq, la phospholipase C et la PKC pour stimuler la croissance cellulaire et altérer les concentrations intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figure 1.8).<sup>42-44</sup> De plus, l'inhibition du système adrénergique et du système rénine-angiotensine-aldostérone fait partie des traitements pharmacologiques couramment utilisés chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque.<sup>65</sup> En conditions expérimentales, le blocage du système rénine-angiotensine-aldostérone atténue le remodelage ventriculaire dans différents modèles de cardiomyopathies. Ce type de traitement régresse aussi l'hypertrophie induite chez des rats transgéniques hypertendus, diminue le développement de l'hypertrophie chez des rats avec une ligature de l'aorte et atténue l'élargissement des myocytes et la réduction de la fraction d'éjection chez des chiens avec de l'insuffisance cardiaque induite par l'accélération du rythme cardiaque. Ces données montrent que le SNS ainsi que le SRAA sont impliqués dans le remodelage et l'hypertrophie cardiaque. La stimulation des récepteurs de ces deux systèmes active les voies de signalisation menant au remodelage et les deux systèmes sont impliqués dans le développement et la détérioration de la maladie.

### **1.2.5 Remodelage et regulation des paramètres d'électrophysiologie cardiaque**

Les patients atteints de cardiomyopathie sont plus à risque d'avoir des arythmies cardiaques.<sup>28</sup> Deux des troubles cardiaques concomitants les plus communs associés à l'hypertrophie et à l'insuffisance cardiaque sont la prolongation de la durée du potentiel d'action<sup>7,12,22</sup> et les troubles de l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>12,22</sup> Tel que vu précédemment, ces troubles peuvent affecter l'excitabilité cardiaque et augmenter l'incidence d'arythmies graves.

### 1.2.5.1 Remodelage cardiaque et retard de repolarisation

Indépendamment de la cause du remodelage cardiaque ou de l'espèce animale étudiée, le retard de repolarisation est un des principaux troubles concomitants les plus observés lors du développement de la cardiomyopathie.<sup>7,12,22</sup> Ainsi, une prolongation de la durée du potentiel d'action a été observée dans différents modèles de remodelage (avec ou sans hypertrophie) comme ceux induits par une augmentation de la pression et/ou du volume sanguin, dans des modèles transgéniques, dans des modèles de troubles métaboliques, lors de l'infarctus (ischémie), dans des modèles d'insuffisance causée par l'accélération du rythme cardiaque et dans le tissu et les cellules ventriculaires d'humains insuffisants cardiaques.<sup>7</sup> De plus, l'ensemble des espèces étudiées incluant le chat, le chien, le rat, le hamster, le lapin, le cobaye, la souris, le furet et l'humain ont montré un retard de repolarisation lors de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaques.<sup>12</sup>

### 1.2.5.2 Remodelage cardiaque et régulation des courants $K^+$

Les courants  $K^+$  sont les principaux courants responsables de la repolarisation et une diminution de ces courants ioniques est souvent observée au cours de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque. Au cours de la cardiomyopathie, la phase hypertrophique n'est pas nécessaire pour affecter les courants  $K^+$ , c'est-à-dire qu'il peut y avoir seulement une dilatation des chambres cardiaques et/ou le développement de l'insuffisance cardiaque (sans présence d'hypertrophie) pour que les courants ioniques soient affectés. Ainsi, plusieurs études ont montré qu'indépendamment du modèle ou de l'espèce étudié, les courants  $K^+$  sont souvent affectés lors de ces atteintes du myocarde.

#### 1.2.5.2a Régulation de $I_{to}$ lors du remodelage cardiaque

Le courant  $K^+$  transitoire sortant indépendant du  $Ca^{2+}$ ,  $I_{to}$ , est le courant  $K^+$  cardiaque le plus souvent étudié et celui qui semble le plus clairement affecté par la cardiomyopathie.<sup>7,12,22</sup> Une diminution de la densité de  $I_{to}$  a ainsi été observée chez les rats

avec de l'hypertrophie induite par des hormones de croissance<sup>66</sup> ou par des catécholamines,<sup>67</sup> chez les rats avec un infarctus du myocarde,<sup>68</sup> chez le furet avec une ligature de l'artère pulmonaire<sup>69</sup>, chez le lapin et le chien insuffisants cardiaques par l'accélération du rythme cardiaque,<sup>70-72</sup> chez le hamster avec une cardiomyopathie héréditaire<sup>73</sup> et chez l'humain souffrant d'insuffisance cardiaque en phase terminale.<sup>74,75</sup> Certaines études montrent que la diminution de  $I_{to}$  est proportionnelle avec le degré de l'atteinte. Par exemple, chez le rat spontanément hypertendu ayant une prolongation de la durée du potentiel d'action, la diminution de  $I_{to}$  est plus prononcée chez les animaux après 18 mois d'hypertension qu'après seulement trois mois.<sup>76</sup> Seulement quelques exceptions ont montré que  $I_{to}$  pourrait être inchangé<sup>77</sup> ou même augmenté.<sup>78</sup>  $I_{to}$  est très important pour la repolarisation ventriculaire des animaux de petite taille, comme la souris. Des changements au niveau de  $I_{to}$  chez ces espèces vont se refléter directement dans la durée du potentiel d'action. D'un autre côté, chez les espèces de moyenne à grande taille (comme le chien ou l'humain),  $I_{to}$  est impliqué dans la phase précoce de repolarisation et est moins important au niveau de la phase 3 de la repolarisation. Malgré tout, ce courant influence grandement la configuration et la durée du potentiel d'action pour l'ensemble des espèces animales et peut ainsi affecter le fonctionnement des autres courants ioniques.<sup>7</sup>

#### *1.2.5.2b Régulation du courant $K^+$ à rectification retardée lors du remodelage cardiaque*

Les différentes composantes du courant  $K^+$  à rectification retardée,  $I_K$ , pourraient aussi être affectées lors du remodelage cardiaque. Toutefois, contrairement au courant  $I_{to}$ , l'effet du remodelage cardiaque sur ce courant est plus controversé. Ainsi, certains groupes ont observé chez les chats ayant subi une ligature de l'artère pulmonaire<sup>79</sup> ou une constriction de l'aorte abdominale,<sup>80</sup> que  $I_K$  était diminué (sans distinction entre les différentes composantes). Cette diminution pourrait être causée par une activation plus lente et une déactivation plus rapide des canaux. Les courants  $K^+$   $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  sont diminués chez les lapins avec une insuffisance cardiaque induite par l'accélération du rythme cardiaque<sup>80</sup> alors que chez le chien ayant subi le même protocole expérimental,  $I_{Ks}$  est

diminué et  $I_{Kr}$  est inchangé.<sup>81</sup> D'un autre côté, plusieurs études semblent montrer que les courants à rectification retardée ne sont pas affectés par le remodelage. Ainsi, il a été démontré que la constriction de l'aorte abdominale chez les cobayes ne produit pas de changement de  $I_K$  et que la prolongation du potentiel d'action pourrait être causée par une augmentation de  $I_{CaL}$ .<sup>82</sup> D'autres études réalisées chez des modèles expérimentaux, tels que le cobaye ayant une augmentation de pression sanguine ou les rats spontanément hypertendus, n'ont pas observé de changement de la densité du courant à rectification retardée.<sup>77,82</sup> Chez l'humain, aucun changement de l'expression de l'ARNm pour le canal hERG ( $I_{Kr}$ ) a été observé.<sup>75</sup> Ainsi, il n'existe pas de réel consensus quand à la régulation de  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  lors du remodelage. Cependant, la majorité de ces études semble indiquer que ces courants ne sont pas régulés.

#### *1.2.5.2c Régulation du courant $K^+$ à rectification entrante lors du remodelage cardiaque*

Comme pour le courant à rectification retardée, les résultats concernant les effets du remodelage cardiaque sur le courant à rectification entrante  $I_{K1}$  sont plutôt variables. Dépendamment des modèles et des espèces étudiées,  $I_{K1}$  pourrait être augmenté,<sup>79</sup> inchangé<sup>70,72,82</sup> ou diminué.<sup>71,74,75,77,81,83</sup> Il semble que la nature de la cardiomyopathie et la sévérité de la maladie pourrait influencer la régulation de  $I_{K1}$ .

#### **1.2.5.3 Régulation des courants potassiques par les voies de signalisation intracellulaire associées au remodelage cardiaque**

La régulation des protéines des voies de signalisation associées avec le remodelage cardiaque, telles que la PKC, la PKA et les protéines dépendantes du  $Ca^{2+}$  intracellulaire (CaM, CaMKII et calcineurine), peut affecter la régulation des canaux  $K^+$ .

### *1.2.5.3a Régulation des canaux $K^+$ par les protéines kinases PKC et PKA*

Les effets de l'activation de la PKC sur les courants  $K^+$  sont variables selon le temps d'activation de la protéine kinase et le courant  $K^+$  à l'étude. Ainsi,  $I_{to}$ , engendré par Kv4.2 et Kv4.3 est diminué dans les oocytes de xénopuces et dans les cellules ventriculaires de rats par l'activation de la PKC.<sup>84-87</sup> D'un autre côté, certains courants à rectification retardée semblent être augmentés par l'activation de la PKC. Par exemple, chez le cobaye (qui n'expriment pas  $I_{to}$ ), la stimulation des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques produit une diminution de la durée du potentiel d'action qui serait reliée à l'activation de la PKC.<sup>88</sup> Selon une autre étude, la régulation du courant  $I_{Ks}$  par l'activation des protéines Gq serait biphasique, soit une activation du courant  $K^+$  par l'activation de la PKC et une inhibition causée par la diminution de PIP2.<sup>89</sup> La PKA peut aussi agir sur le courant  $K^+$  à rectification retardée. Par exemple, une étude a montré que la synthèse protéique du canal HERG serait stimulée par la PKA.<sup>90</sup> Aussi, l'amplitude du courant produit par le canal Kv1.5 (correspondant à  $I_{Kur}$ ) est diminuée par une inhibition de la PKA.<sup>91</sup> Une autre étude a montré que  $I_{Kur}$  serait augmenté par la l'administration d'isoprotérénol (agoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques) et diminué par la phényléphrine (agoniste  $\alpha$ -adrénergique). Ces deux différents types de régulation seraient dépendants de l'activation de la PKA et de la PKC, respectivement.<sup>92</sup> Finalement, l'augmentation de l'expression du canal HERG produite par l'activation du récepteur  $\alpha_1$ -adrénergique serait aussi dépendantes de l'activité des protéines PKC et PKA dans des cellules en culture (en conditions aigues).<sup>93</sup>

### *1.2.5.3b Régulation des canaux $K^+$ par les protéines dépendantes du $Ca^{2+}$ intracellulaire*

D'un autre côté, les changements de concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire modulent l'activité des protéines dépendantes du  $Ca^{2+}$  qui semblent aussi réguler les courants  $K^+$ . Une activation à court ou à long terme de la CaMKII agit différemment les courants  $K^+$ . Ainsi, un activation chronique de CaMKII produit une prolongation de la durée du potentiel d'action qui serait causée par une diminution des courants  $I_{to}$  (la composante rapide,  $I_{to,f}$ ,

générée par Kv4.2 et Kv4.3) et  $I_{K1}$ .<sup>94,95</sup>, alors qu'une activation aigue produit un raccourcissement du potentiel d'action causé par une augmentation de  $I_{to,s}$  et  $I_{K1}$ .<sup>94</sup> Dans une autre étude, la diminution de  $I_{to}$ , causée par l'accélération du rythme cardiaque, est empêchée par l'inhibition de la calmoduline, de la CaMKII ou de la calcineurine.<sup>96</sup> Ces études montrent que les cascades de signalisation dépendantes du  $Ca^{2+}$  intracellulaire régulent les courants  $K^+$ .

#### 1.2.5.4 Régulation du courant $Ca^{2+}$

Le courant  $Ca^{2+}$  de type L,  $I_{CaL}$ , peut influencer la durée du potentiel d'action et est aussi régulés lors du remodelage cardiaque. Comme pour les courants  $K^+$   $I_K$  et  $I_{K1}$ , il existe beaucoup de variabilité dans les résultats des études sur la régulation du courant  $Ca^{2+}$  au cours du remodelage cardiaque. En général, il semble que la régulation de la densité des courants  $Ca^{2+}$  soit directement reliée à la sévérité de l'atteinte cardiaque et à la cause de la cardiomyopathie. Ainsi,  $I_{CaL}$  semble être augmenté dans l'hypertrophie légère, inchangé dans l'hypertrophie moyenne et diminué dans l'hypertrophie sévère.<sup>7,74,97</sup>

Le courant  $I_{CaL}$  est présent au cours de la phase plateau du potentiel d'action. Une variation dans la durée du potentiel d'action, plus particulièrement par des modifications des courants ioniques au début du potentiel d'action, peut modifier la fenêtre d'activation de  $I_{CaL}$  ainsi que la quantité de  $Ca^{2+}$  qui entre dans la cellule. Ainsi, la prolongation de la durée du potentiel d'action produite par une diminution de  $I_{to}$  pourrait donc affecter les niveaux de  $Ca^{2+}$  entrant dans les cellules même dans les cas où aucun changement dans la densité de courant calcique ne serait observé. Malgré tout, la régulation du courant  $I_{CaL}$  ne semble pas jouer un rôle déterminant dans la prolongation du potentiel d'action, puisque la prolongation est maintenue chez les patients en phase avancée d'insuffisance cardiaque indépendamment de l'activation ou du blocage de  $I_{CaL}$ .<sup>98,99</sup>

Certaines études ont aussi montré que le courant  $Ca^{2+}$  de type T peut être augmenté lors de l'hypertrophie et du remodelage cardiaque, entre autres, dans les cellules de rats

nouveau-nés en culture<sup>100</sup> ou chez les hamsters avec une cardiomyopathie héréditaire<sup>20</sup>. Ces courants pourraient affecter la régulation des concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et leur réapparition au cours du remodelage cardiaque suggère qu'ils pourraient jouer un rôle dans le développement de la pathologie.

#### 1.2.5.5 Mode de régulation des courants ioniques

Les changements de densité des courants ioniques sont causés par la régulation des propriétés d'activation et d'inactivation ou par des changements dans les niveaux d'expression des canaux à la membrane cellulaire. Il semble qu'au cours de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque, les deux modes de régulation des courants ioniques ont été observés. Par exemple, l'expression de l'ARNm et des protéines du canal Kv4.2 ( $I_{to}$ ) est diminuée dans les myocytes hypertrophiés de rats avec infarctus.<sup>101</sup> Chez l'humain insuffisant cardiaque<sup>75</sup> et le chien rendu insuffisant par stimulation du rythme cardiaque,<sup>70,71</sup> la diminution de l'expression de l'ARNm de Kv4.3 serait la cause de la réduction de  $I_{to}$ . D'autres études ont montré que la diminution des courants ioniques pourrait être associée avec des changements de propriétés d'activation et d'inactivation des courants  $I_{to}$ ,  $I_K$ ,  $I_{K1}$ ,  $I_{CaL}$  et  $I_{CaT}$ .<sup>78,79, 80, 100</sup> Les protéines des cascades de signalisation associées avec le remodelage cardiaque (la PKA, la PKC, CaMKII, ERK/MAPK) peuvent réguler l'expression des canaux ioniques ou leurs propriétés cinétiques.<sup>102-104</sup> Ces protéines kinases peuvent entre autres agir directement sur les canaux ioniques en phosphorylant des sites plus ou moins spécifiques. Des études ont identifié certains sites de phosphorylation au niveau des canaux Kv4.2 et Kv4.3, responsables de  $I_{to}$ . Ces canaux possèdent des sites de phosphorylation pour la PKC, tels que Ser82 ou Ser475 qui sont hautement conservés chez plusieurs espèces telles que l'homme, la souris et le rat.<sup>86</sup> D'autres études ont utilisé des protéines synthétiques et des cellules de l'hippocampe, pour montrer que le canal Kv4.2 semble aussi avoir des sites de phosphorylation pour la protéine ERK (MAPK).<sup>105</sup> Finalement, la mutation du résidu Ser550 (site consensus de phosphorylation) du canal Kv4.3 empêche l'augmentation du courant  $I_{to}$  par l'activation de la CaMKII.<sup>86</sup> Ainsi, des



changements dans l'expression des canaux et dans les propriétés cinétiques des courants peuvent tous être en cause dans la régulation des courants ioniques au cours du remodelage cardiaque.

Il est aussi possible que des changements dans la densité des courants surviennent pour compenser d'autres phénomènes impliqués dans le développement de la maladie. Par exemple, le courant  $I_{CaL}$  pourrait être augmenté pour compenser des troubles de l'homéostasie du  $Ca^{2+}$  tel qu'une diminution l'activité de la pompe SERCA.<sup>106,107</sup> La diminution des courants  $K^+$ , qui prolonge la durée du potentiel d'action et peut modifier la fenêtre d'activation du courant  $Ca^{2+}$ , pourrait alors représenter un changement adaptatif bénéfique dans les cœurs hypertrophiés ou insuffisants puisqu'elle produirait une augmentation de l'entrée du  $Ca^{2+}$  associée avec des effets inotropes positifs. Toutefois, cette diminution des courants  $K^+$  n'est pas seulement bénéfique puisque la diminution des courants  $K^+$  prolonge la repolarisation et représente ainsi un facteur de risque important pour le développement d'arythmies cardiaques.

Le phénotype cardiaque est très différent entre les cœurs ayant de l'hypertrophie ou du remodelage compensé comparativement à ceux en insuffisance cardiaque (décompensé). L'espèce étudiée, le modèle expérimental ainsi que les conditions expérimentales influencent les résultats et font en sorte que les conclusions des études sont parfois controversées entre les différents groupes. Malgré tout, les troubles de repolarisation restent un des problèmes majeurs associés avec les cardiomyopathies.

### **1.2.6 Régulation de l'homéostasie du $Ca^{2+}$**

En plus de la régulation des différents courants ioniques membranaires, des changements dans la régulation de l'homéostasie du  $Ca^{2+}$  intracellulaire sont aussi présents dans l'hypertrophie et le remodelage cardiaques. Différentes études ont montré que l'activité ou l'expression de la pompe SERCA, de NCX et du RYR sont affectées dans plusieurs modèles de cardiomyopathie. Comme pour les canaux ioniques, il existe plusieurs

contradictions dans la régulation de l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  dépendamment des espèces, du modèle de cardiomyopathie et de la sévérité de la maladie. Dans la majorité des cas, l'activité de SERCA est diminuée alors que celle de NCX et de RyR est modulée différemment selon les études.<sup>7,22</sup> Ces changements dans l'activité des protéines régulant l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  affectent la relâche de  $\text{Ca}^{2+}$  et modifient les concentrations intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces changements auront un effet sur les voies de signalisation dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  (discutées précédemment) et affecteront la contraction du myocarde et représenteront un facteur de risque à la survenue d'arythmies.

### 1.2.7 Arythmies associées avec le remodelage cardiaque

Les différents mécanismes de compensation activés lors du développement de la cardiomyopathie ainsi que le remodelage cardiaque représentent un facteur de risque à la survenue d'arythmies graves pouvant mener à la mort. Les tachycardies ventriculaires, un des types d'arythmies les plus fréquemment observés chez les patients avec des cardiomyopathies, seraient souvent associées avec une diminution de la fonction cardiaque. Toutefois, les patients ayant du remodelage cardiaque qui n'ont pas d'atteinte de la fonction cardiaque ont aussi plus de risque de mort subite.<sup>108</sup>

Le décès spontané des patients insuffisants cardiaques en phase terminale est causé dans environ 50% des cas par une tachycardie ou une fibrillation ventriculaire.<sup>109,110</sup> Chez ces patients, des troubles du rythme de type EADs peuvent être observées suite à une stimulation adrénergique (associés avec une prolongation du potentiel d'action et à une augmentation de la fenêtre d'activation des courants  $\text{Ca}^{2+}$ ).<sup>111</sup> Des EADs ont aussi été observées dans différents modèles animaux tels que chez le chien insuffisant par l'accélération du rythme cardiaque<sup>81,112</sup> chez les chiens avec de l'hypertrophie,<sup>113</sup> chez le lapin avec hypertrophie cardiaque,<sup>114</sup> chez le chat (avec diminution de  $I_K$ )<sup>80</sup> et chez le rat avec hypertension rénale ou un infarctus du myocarde.<sup>68,115</sup> Dans la plupart des cas, les risques d'arythmies sont reliés avec une prolongation de la durée du potentiel d'action et à

une diminution des courants  $K^+$ . Des troubles du rythme de type DADs ont aussi été observées dans des cœurs insuffisants. Ce type de problèmes survient fréquemment en présence de norépinéphrine et tel que vu précédemment, lorsque les niveaux de catécholamines sont élevés chez les patients présentant du remodelage et de l'insuffisance cardiaques.<sup>7,116</sup> Les troubles du rythme de type DADs et EADs favorisent le développement d'arythmies soutenues plus graves telles que les tachycardies (comme la Torsade de pointe) ou les fibrillations ventriculaires qui peuvent conduire à la mort. Finalement, des arythmies de type « réentrée » pourraient aussi être observées et seraient causées par des changements dans la structure et dans les propriétés intrinsèques des cellules cardiaques.<sup>22</sup>

### **1.2.8 Résumé de la pathophysiologie des cardiomyopathies**

Toutes les formes de cardiomyopathies sont associées avec d'autres types d'atteintes cardiaques telles que les arythmies. Le retard de repolarisation et les troubles de l'homéostasie du  $Ca^{2+}$  sont fréquemment observés chez les patients et dans les modèles animaux présentant du remodelage cardiaque. Différents stimuli activés au cours du remodelage cardiaque pourraient influencer la régulation des courants ioniques et contribuer différemment au développement du phénotype pathologique cardiaque. Nous savons que le système nerveux sympathique (principalement adrénérique) et le système rénine-angiotensine-aldostérone sont activés au cours du développement de l'hypertrophie compensatoire et lors de la progression de la maladie vers la décompensation et la perte de la fonction cardiaque. De plus, des évidences montrent que la stimulation spécifique des récepteurs  $\alpha$ -adrénériques et des récepteurs de type 1 de l'angiotensine II pourraient affecter les courants ioniques. Il devient alors intéressant d'étudier spécifiquement ces voies impliquées dans le remodelage cardiaque afin de voir comment elles peuvent affecter la repolarisation et contribuer à l'apparition d'arythmies cardiaques.

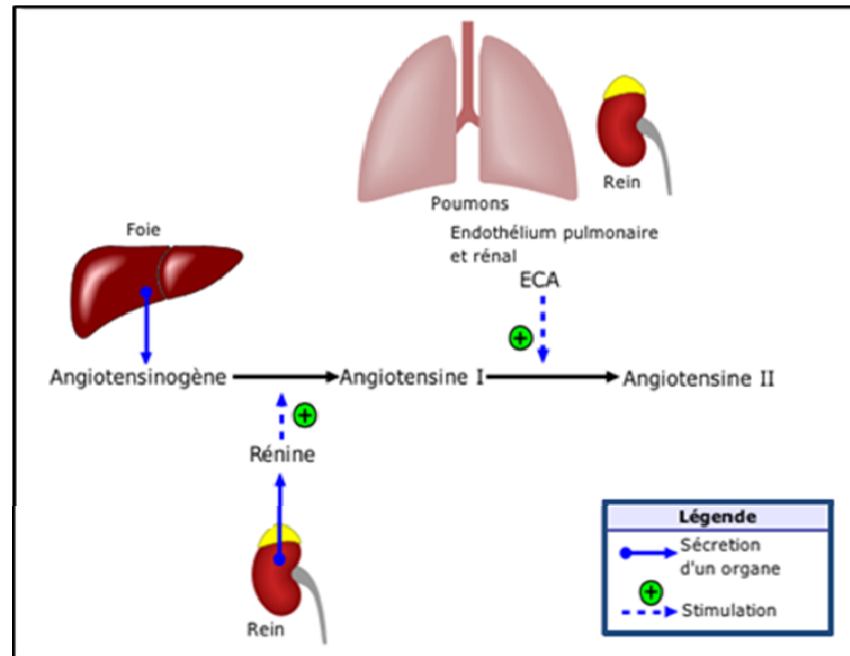
## 1.3 L'angiotensine II

Le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) est un joueur important dans la régulation à court et long terme de la tension artérielle, mais il est aussi associé avec plusieurs conditions pathologiques telles que l'hypertension et le remodelage cardiaque.<sup>65,117-123</sup> L'activation de SRAA conduit à la production et à la relâche de son principal effecteur, l'angiotensine II (Ang II). Une fois relâchée, l'Ang II agit de façon systémique dans différents organes cibles ou de façon autocrine-paracrine via la production et la relâche locales du peptide dans certains organes.

### 1.3.1 La biosynthèse de l'angiotensine II

L'Ang II est un octapeptide produit par une cascade de réaction enzymatique. La synthèse de l'Ang II peut se faire au niveau systémique (voie systémique) ou au niveau de certains organes (voie locale). Les deux voies de biosynthèse produisent l'Ang II en utilisant sensiblement les mêmes enzymes (Figure 1.10).<sup>65</sup>

La synthèse systémique de l'Ang II débute à partir de l'angiotensinogène (AGN) produite au niveau du foie. La rénine synthétisée au niveau rénal clive l'AGN en angiotensine I (Ang I). Par la suite, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), synthétisée entre autres par les poumons, transformera l'Ang I en Ang II. Une fois synthétisée, l'Ang II pourra agir en liant spécifiquement les récepteurs se trouvant au niveau des cellules de plusieurs organes cibles tels que les reins, le cœur, le foie, les muscles lisses vasculaires et le système nerveux.<sup>122,124,125</sup> Des angiotensinases non spécifiques telles que des endopeptidases, des aminopeptidases et des carboxypeptidases vont par la suite dégrader l'Ang II.<sup>122,126</sup>



**Figure 1.10 La biosynthèse de l'angiotensine II** (adaptée de [http://fr.wikipedia.org/wiki/Système\\_rénine-angiotensine-aldostérone](http://fr.wikipedia.org/wiki/Système_rénine-angiotensine-aldostérone)). La biosynthèse de l'Ang II débute par la sécrétion de l'angiotensinogène au niveau du foie. La rénine, synthétisée et sécrétée par les reins, transforme aussi l'angiotensinogène en angiotensine I et finalement, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) transforme l'Ang I en Ang II.

Au niveau local, les tissus capables de produire localement de l'Ang II, dont le cœur, le cerveau, les reins et les vaisseaux sanguins, expriment en partie ou entièrement les enzymes impliqués dans la cascade de réactions menant à la synthèse de l'Ang II.<sup>120,127-129</sup> Ces tissus expriment l'ARNm de l'AGN, de la rénine et/ou de l'ECA. La synthèse endogène d'Ang II par le muscle cardiaque n'influencerait pas les niveaux systémiques d'Ang II.<sup>122</sup> Le rôle de ce système local est encore peu connu mais il pourrait être impliqué dans la régulation fine de certains phénomènes et/ou pourrait jouer un rôle important dans le développement de certaines conditions pathologiques telles que l'arythmogénèse, l'hypertrophie et le remodelage cardiaques.<sup>129,130</sup> Un système de biosynthèse complémentaire du SRAA classique peut aussi participer à la production de l'Ang II. Ce système serait capable de produire de l'Ang II localement indépendamment de l'action de

la rénine ou de l'ECA en utilisant des enzymes telles que la cathepsine G, la tonine et la chymase.<sup>131</sup> Les deux voies de biosynthèse de l'Ang II, endocrine et autocrine-paracrine, ainsi que la présence d'enzymes complémentaires montrent que la production d'Ang II est régulée de plusieurs façons pour assurer un bon contrôle des niveaux de ce peptide dans l'organisme.<sup>127,128</sup>

### **1.3.2 Les récepteurs de l'angiotensine II**

Afin de produire ses effets au niveau des cellules des différents organes cibles, l'Ang II se lie à ses récepteurs spécifiques. Jusqu'à maintenant, deux types principaux de récepteurs à l'Ang II ont été clonés soient le récepteur de type 1 (AT1) et le récepteur de type 2 (AT2). Deux autres récepteurs ont été identifiés, les récepteurs AT3 et AT4, mais ceux-ci ne sont pas encore caractérisés et leur rôle reste encore à être clarifié.<sup>132</sup> Les récepteurs de l'Ang II sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G.<sup>120,133,134</sup>

#### **1.3.2.1 Le récepteur de type 1 de l'angiotensine II**

La majorité des effets physiologiques et pathologiques de l'Ang II au niveau cardiovasculaire, neuronal, rénal, endocrinien et hépatique est principalement médié via le récepteur AT1.<sup>120,122,124</sup> Le récepteur AT1 se retrouve dans plusieurs tissus tels que le cœur, le cortex surrénalien, le foie, les reins, les muscles lisses vasculaires et certaines régions du cerveau. Chez certaines espèces de rongeurs comme la souris, le rat et le lapin, il existe deux sous-types de récepteurs AT1 : AT1a et AT1b.<sup>120,135</sup> Ces deux sous-types de récepteur ont une séquence d'acides aminés identique à 95% et diffèrent principalement par leur distribution tissulaire, leur localisation chromosomique, leur structure génomique et leur régulation transcriptionnelle.<sup>120</sup>

L'exposition des récepteurs AT1 de cellules normales à l'Ang II cause une perte rapide de la réponse du récepteur. Ce phénomène de désensibilisation se produit par une

diminution de l'expression du récepteur AT1 à la surface de la cellule. Elle est causée par une internalisation du récepteur et de son ligand afin de diminuer l'activité du récepteur et contrôler les effets de l'Ang II. Il a aussi été proposé que l'internalisation du récepteur avec le ligand permettrait la resensibilisation et le recyclage du récepteur en le déphosphorylant et permettrait une redistribution de l'Ang II à l'intérieur de la cellule pour produire d'autres effets et même protéger l'Ang II de la dégradation. Une stimulation à long terme du récepteur AT1 par l'Ang II provoque un état d'équilibre entre le nombre de récepteurs internalisés et ceux recyclés.<sup>136,137</sup>

### **1.3.2.2 Le récepteur de type 2 de l'angiotensine II**

Le récepteur AT2 est moins connu que le récepteur AT1. AT2 est exprimé en grande quantité dans plusieurs tissus chez le fœtus et serait impliqué dans son développement.<sup>120,126</sup> Toutefois, à l'âge adulte, l'expression de AT2 est moins importante et on le retrouve en faible concentration seulement dans quelques tissus tels que l'endothélium vasculaire, la médullosurrénale, le cerveau, le cœur, le muscle lisse utérin et les ovaires.<sup>133</sup> Son rôle physiologique chez l'adulte est encore incertain. Toutefois, en conditions pathologiques telles que l'infarctus du myocarde, l'ischémie ou l'insuffisance rénale, l'expression de AT2 pourrait être augmentée de façon importante<sup>126,138,139</sup> pour contrebalancer les effets de AT1 par des effets vasodilatateurs, anti-prolifératifs, pro-apoptotiques, de différenciation cellulaire et de réparation tissulaire.<sup>132,140,141</sup> Ainsi, comparativement au récepteur AT1, le récepteur AT2 aurait des effets cardioprotecteurs.

### **1.3.2.3 La signalisation intracellulaire des récepteurs à l'angiotensine II**

Plusieurs études ont montré que les deux types de récepteurs de l'Ang II produisent leurs effets via plusieurs voies de signalisations intracellulaires. AT1 et AT2 sont tous deux couplés avec les protéines G. La majorité des effets physiologiques et pathologiques de l'Ang II sont médiés par le récepteur AT1 et sa signalisation est mieux connue que celle de

AT2. Le récepteur AT1 de l'Ang II est aussi un des récepteurs à l'étude dans ce projet de doctorat, alors les prochaines sections seront consacrées à la description de ce récepteur.

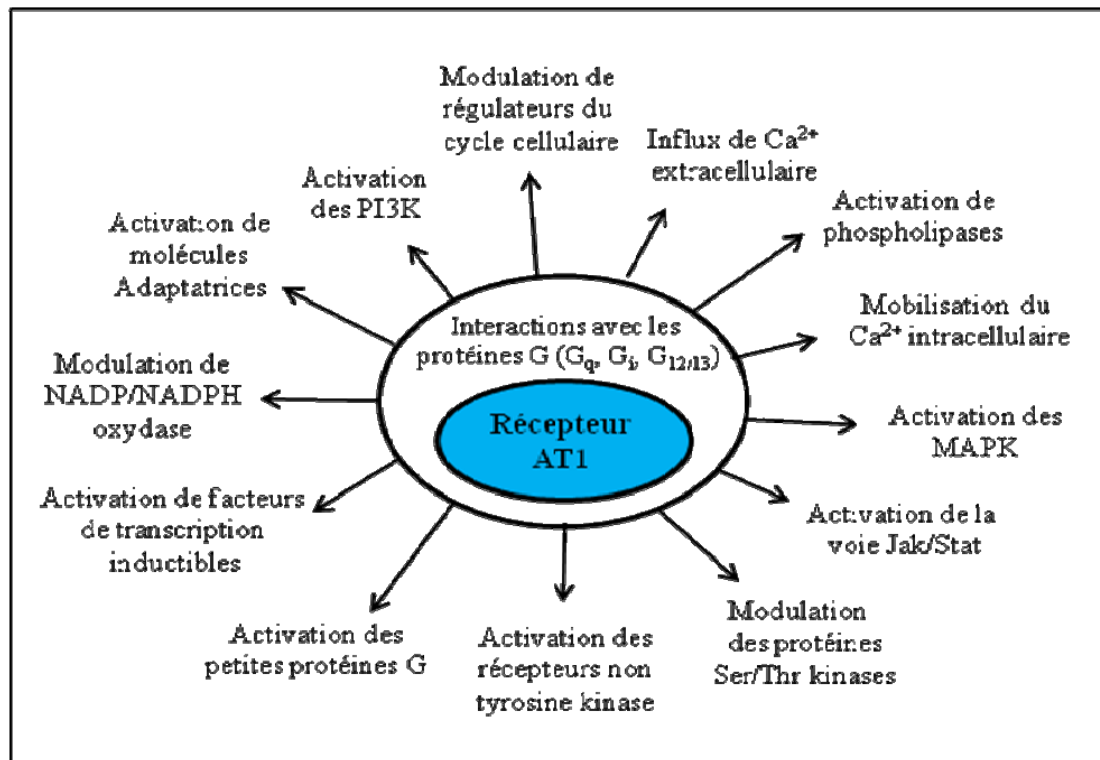
Le récepteur AT1 est couplé à plusieurs types de protéines G soient la Gq, la Gi et la G<sub>12/13</sub>.<sup>122</sup> Comme nous l'avons vu dans la section précédente, l'activation de la protéine Gq libère la sous-unité  $\alpha$  qui stimule la PLC pour produire l'IP<sub>3</sub> et le DAG à partir du PIP2 pour induire une augmentation des concentrations de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et l'activation de la PKC respectivement. D'autre part l'activation de la G $\alpha_i$  produira une inhibition de l'AC et une diminution des niveaux d'AMPc qui aura pour effet de diminuer l'activité de la PKA.<sup>122,142</sup> L'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire qui agit sur plusieurs voies de signalisation dépendantes du Ca<sup>2+</sup> (via la CaM), l'activation de la PKC et l'inhibition de PKA sont associés avec la croissance cellulaire, le remodelage et l'hypertrophie cardiaque.<sup>122,142</sup>

En plus des voies de signalisation intracellulaires conventionnelles associées aux sous-unités  $\alpha$  des protéines G, l'Ang II induit aussi d'autres voies typiquement reliées à la croissance cellulaire et à l'inflammation.<sup>130</sup> Ainsi, la liaison de l'Ang II au récepteur AT1 peut aussi activer les sous-unités G $\beta\gamma$  qui iront activer les tyrosines kinases, les petites protéines G (Rho) et la voie JAK/STAT.<sup>122,130</sup> Ces voies sont associés avec la croissance cellulaire, le remodelage tissulaire ainsi qu'avec des processus inflammatoires.<sup>122,143</sup>

La réponse intracellulaire à la stimulation des récepteurs AT1 est tissu-spécifique et dépend de la présence d'autres récepteurs et des seconds messagers disponibles.<sup>122</sup> Ainsi, les différentes voies de signalisations intracellulaires activées par les protéines G et par l'activation d'autres protéines auront une multitude d'effets dépendamment du tissu et du type de cellules touchés. Parmi ces effets, on note l'induction de facteurs de transcription (c-fos, c-jun, c-Myc), la régulation de l'homéostasie du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, l'activation de voies dépendantes du Ca<sup>2+</sup> (CaM, CaMKII, calcineurine), activation de la voie JAK/STAT et de la voie des MAPK et la régulation du transport membranaire (Figure 1.11).<sup>122,130,142,143</sup>



L'ensemble de ces voies de régulation vont produire les effets physiologiques et pathologiques de l'Ang II médiés par l'activation des récepteurs AT1.



**Figure 1.11** Les différentes voies de signalisation impliquées dans la réponse de la stimulation des récepteurs AT1 (adaptée de <sup>122</sup>). L'activité de plusieurs protéines telles que les phospholipases, les MAPK et les petites protéines G est influencée par l'activation des récepteurs AT1.

### 1.3.3 Le rôle de l'angiotensine II

#### 1.3.3.1 Les effets systémiques de l'angiotensine II

L'angiotensine II joue un rôle physiologique essentiel. Les différentes voies de signalisation intracellulaires activées par la liaison de l'Ang II au récepteur AT1 produisent plusieurs effets tels que la contraction des cellules musculaires lisses, la régulation de la stéroïdogénèse (par exemple, la sécrétion de l'aldostérone), la neurosécrétion d'hormones

et d'autres molécules vasoactives, la régulation du transport d'ions ainsi que la croissance et la prolifération cellulaires.<sup>120</sup> Toutes les réponses cellulaires induites dans différents organes participent à plusieurs phénomènes physiologiques tels que le contrôle rapide de la pression artérielle par la vasoconstriction et le contrôle plus lent de la pression par la régulation de la balance électrolytique et hydrique, la sécrétion hormonale et la régulation de la fonction rénale.<sup>120,124</sup> Des études faites sur des modèles de souris transgéniques ont montré qu'une diminution de l'action de l'Ang II par la délétion de gènes codant pour l'AGN, pour l'ECA ou pour le récepteur AT1a cause une diminution de la pression sanguine, une diminution de la réponse aux changements de pression et une diminution de la survie des animaux.<sup>144</sup> L'Ang II participe aussi à la modification de la structure vasculaire et cardiaque qui mène au remodelage par l'activation de facteurs de croissance, la stimulation de la synthèse protéique et l'augmentation de la matrice extracellulaire.<sup>120,122</sup> En conditions normales, tous ces mécanismes ont des effets cardiovasculaires bénéfiques et tentent de maintenir le fonctionnement normal du système cardiovasculaire et de compenser pour des variations physiologiques ou pathologiques. Toutefois, la stimulation du SRAA sur une longue période ou de façon excessive favorise le transfert du phénomène de compensation vers une diminution de l'efficacité des mécanismes adaptatifs cardiovasculaires et vers la décompensation de la fonction cardiaque. D'ailleurs, il a été rapporté que les hauts niveaux d'Ang II sont directement associés à divers troubles cardiovasculaires comme l'hypertension, l'hypertrophie, l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque.<sup>145-148</sup> Une augmentation de l'action de l'Ang II par une augmentation de l'expression de ses précurseurs et de sa concentration ou par l'activation excessive des récepteurs AT1 est la cause de plusieurs maladies cardiovasculaires. Par exemple, une augmentation de l'expression de l'ECA est associée à l'hypertrophie ventriculaire, à l'infarctus du myocarde et à l'insuffisance cardiaque congestive.<sup>145-147</sup> Aussi, le récepteur AT1 ainsi que l'ECA présentent des polymorphismes spécifiques associés à une ou l'autre de ces pathologies.<sup>120,122,129</sup> Ainsi, les effets pathologiques de

l'Ang II au niveau du cœur peuvent être la conséquence directe ou indirecte de la stimulation des récepteurs AT1.

### **1.3.3.2 Les effets pathologiques indirects de l'angiotensine II au niveau cardiaque**

L'augmentation de l'action de l'Ang II au niveau systémique produit une vasoconstriction, ce qui conduit à une augmentation de la pression sanguine. Une élévation soutenue de la pression menant à l'hypertension chronique provoque des changements adaptatifs dans divers organes, entre autres, au niveau des reins et du cœur. L'augmentation de la pression sur les parois du muscle cardiaque active divers mécanismes compensatoires qui résulteront en hypertrophie des cardiomyocytes et en remodelage global du tissu.<sup>122</sup> Ce remodelage est caractérisé par le dépôt de collagène, la prolifération des fibroblastes et la perte de cardiomyocytes (par l'apoptose) qui diminuent la fonction cardiaque et mène à l'insuffisance cardiaque. Il a été montré qu'il est possible de prévenir l'hypertrophie ventriculaire gauche chez des rats spontanément hypertendus ou de faire régresser l'hypertrophie due à l'hypertension chronique chez l'humain en inhibant les effets de l'Ang II par l'administration d'inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) ou d'antagonistes spécifiques des récepteurs de type 1 de l'angiotensine II (ARA).<sup>127</sup> De plus, ces agents pharmacologiques sont reconnus pour avoir plusieurs effets bénéfiques dans le traitement de l'insuffisance cardiaque, sur la fibrose et sur la taille de l'infarctus lorsqu'ils sont administrés de façon systémique.<sup>127,148,149</sup>

### **1.3.3.3 Les effets pathologiques directs de l'angiotensine II au niveau cardiaque**

Le cœur peut synthétiser de façon endogène l'Ang II.<sup>120,127-129</sup> Cette synthèse locale de l'AngII pourrait être associée avec les effets pathologiques de l'Ang II. L'Ang II peut agir directement au niveau du myocarde puisque les récepteurs AT1 sont exprimés au niveau des cardiomyocytes.<sup>120,135</sup> Plusieurs études ont démontré que l'action de l'Ang II via les récepteurs AT1 exprimés au niveau cardiaque serait responsable de plusieurs troubles pathologiques. Il a d'ailleurs été rapporté qu'au niveau cellulaire, l'Ang II induit

l'augmentation de la synthèse protéique et le grossissement des cellules (correspondant à l'hypertrophie)<sup>43,150</sup> et entraîne l'augmentation du nombre de cellules (hyperplasie).<sup>120</sup> De plus, l'Ang II bloque l'activité des métalloprotéinases 1 (MMP-1) (impliquée dans la dégradation du collagène), ce qui favorise la prolifération de la matrice extracellulaire et l'accumulation de collagène.<sup>120</sup> L'Ang II peut donc agir directement sur les cellules cardiaques pour induire l'hypertrophie et le remodelage. Il a aussi été démontré que les effets néfastes de l'Ang II sur les cardiomyocytes sont médiés par le récepteur AT1. L'expression de ce récepteur est augmentée dans plusieurs modèles d'hypertrophie cardiaque.<sup>151,152</sup> De plus, des études réalisées sur des modèles de souris transgéniques ont montré que la surexpression de l'AGN ou du récepteur AT1 spécifiquement au niveau cardiaque induit l'hypertrophie et le remodelage cardiaque indépendamment de changements hémodynamiques.<sup>121,153</sup> Finalement, le traitement avec des séquences d'ARN anti-sens du récepteur AT1 protège les rats de l'apparition de l'hypertrophie et renverse même l'hypertrophie causée par une augmentation de l'activité du SRAA.<sup>154</sup> La stimulation accrue du récepteur AT1 peut donc être directement responsable de l'apparition des troubles cardiaques tels que l'hypertrophie et le remodelage.

#### **1.3.3.4 Rôle de l'angiotensine II dans la régulation des courants ioniques et la survenue d'arythmies cardiaques**

L'association entre le remodelage cardiaque, la stimulation du système rénine-angiotensine-aldostérone et le développement d'arythmies cardiaques a été précédemment observée. Les arythmies observées lors du remodelage cardiaque sont associées particulièrement avec des troubles de repolarisation et une diminution des courants  $K^+$  (voir section 1.2). Plusieurs études ont suggéré que le SRAA pouvait réguler les courants ioniques et être responsable de la survenue d'arythmies cardiaques.

Plusieurs études ont montré que l'Ang II pouvait réguler les courants ioniques par l'administration d'Ang II ou à l'aide de modèles transgéniques. Tout d'abord, le traitement

des cardiomyocytes ventriculaires de rats avec l'Ang II diminue le courant  $K^+$   $I_{sus}$  et prolonge la durée du potentiel d'action. Cette régulation du courant  $K^+$  serait causée par l'activation du récepteur AT1 et médié par les PKC.<sup>155</sup> Le groupe de Shimoni<sup>156-158</sup> a fait plusieurs études sur les effets l'Ang II sur les courants  $K^+$ . La plupart de ces études ont été faites dans des modèles de souris ou de rats diabétiques où les niveaux d'Ang II sont élevés comparativement aux animaux non-diabétiques. Ces études semblent montrer que l'Ang II pourrait affecter plusieurs courants  $K^+$ . Toutefois, beaucoup de facteurs confondants sont présents dans ces modèles (comme le traitement à la streptozotocine et les niveaux élevés de glucose) et rendent l'association réelle entre l'Ang II et la régulation des courants  $K^+$  moins évidente.<sup>156-158</sup> La souris transgénique surexprimant l'ECA spécifiquement au niveau cardiaque (produisant plus d'Ang II spécifiquement dans cet organe) présente de l'hypertrophie seulement au niveau des oreillettes. Cette souris transgénique a une incidence accrue d'arythmies telles que des fibrillations auriculaires et des blocs de conduction et il est aussi plus facile d'induire des tachycardies ventriculaires chez ces souris comparativement aux souris de type sauvage.<sup>118,159</sup> Ces troubles du rythme seraient causés, entre autres, par des modifications dans l'expression des connexines Cx40 et Cx43.<sup>159</sup> Cx43.<sup>159</sup> Au cours des dernières années, le groupe de Domenighetti et al.<sup>117</sup> a utilisé la souris transgénique surexprimant l'angiotensinogène spécifiquement dans le cœur (qui produit des niveaux cardiaques d'Ang II plus élevés) pour étudier les effets de l'Ang II sur le muscle cardiaque. Cette souris développe de l'hypertrophie cardiaque et présente une plus grande incidence de mort subite. Ces troubles sont aussi associés à une prolongation de l'intervalle QT et une prolongation de la durée du potentiel d'action (à 90% de la repolarisation seulement) et à une incidence accrue d'arythmies ventriculaires. Selon cette étude, ces troubles du rythme seraient reliés à une diminution du courant  $K^+$ ,  $I_{K1}$ , causée par une diminution de l'expression de l'ARNm des canaux Kir2.1 et Kir2.2. En plus de causer un retard de repolarisation, l'Ang II pourrait aussi affecter le courant  $Ca^{2+}$  ( $I_{CaL}$ ). La perfusion de cardiomyocytes de rats avec de l'Ang II ( $10^8$  mmol/L) produit une diminution du courant  $I_{CaL}$ . Cette diminution de  $I_{CaL}$  n'est pas empêchée par le losartan (un inhibiteur

du récepteur de type 1 de l'Ang II) et ne serait pas associée avec des changements dans les niveaux d'AMPc ni avec des modifications de l'activité de la PKC (donc indépendant de l'activation des protéines Gq et Gi).<sup>160</sup> Finalement, il a aussi été montré que le courant  $\text{Ca}^{2+}$  de type T ( $\text{I}_{\text{CaT}}$ ) est augmentés par l'Ang II, entre autres, par une augmentation de l'expression du canal  $\text{Ca}_v1.3$ .<sup>100</sup>

D'autres études ont utilisé des bloqueurs du SRAA, soient des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'Ang II (IECA) ou antagonistes des récepteurs de l'Ang II (ARA) afin de déterminer le rôle de l'Ang II dans le remodelage électrique et l'apparition d'arythmies. Ainsi, les IECA ou les ARA diminuent le remodelage cardiaque, améliorent les paramètres électrophysiologiques et diminuent les risques d'arythmies dans les cellules en culture ainsi que chez les patients et dans les modèles animaux avec hypertrophie et insuffisance cardiaque. Par exemple, dans les cardiomyocytes auriculaires de rats nouveau-nés hypertrophiés, le traitement avec du losartan empêche le développement de l'hypertrophie des cellules et prévient les variations d'expression des canaux  $\text{K}^+$  et les modifications de la densité des courants  $\text{K}^+$  correspondants à ces canaux.<sup>161</sup> Chez des rats spontanément hypertendus (SHR), l'administration de losartan diminue l'hypertrophie, raccourcit le durée du potentiel d'action et augmente la densité de  $\text{I}_{\text{to}}$ .<sup>162</sup> Chez la souris ayant de l'hypertrophie du ventricule gauche induite par la constriction de l'aorte, l'administration d'un autre ARA, le candésartan, diminue l'hypertrophie et réduit l'incidence d'arythmies telles que des tachycardies ventriculaires et des fibrillations auriculaires.<sup>163</sup> Chez les lapins, la ligature de l'artère rénale augmente la pression sanguine et produit du remodelage cardiaque ainsi qu'une prolongation de la durée du potentiel d'action. Chez ces lapins, l'administration de captopril (IECA) empêche le développement de l'hypertrophie, normalise les paramètres électrophysiologiques et diminue ainsi la vulnérabilité des animaux à faire des fibrillations ventriculaires.<sup>119</sup> Finalement, le traitement avec des IECA chez des patients avec de l'hypertrophie réduit la durée de l'intervalle QT.<sup>164,165</sup> Ainsi, l'utilisation des bloqueurs du SRAA montre l'implication de ce système dans l'incidence accrue d'arythmies associée avec le remodelage cardiaque. De plus, l'effet

spécifique des ARA sur les récepteurs AT1 confirme l'implication de l'activation de ce récepteur dans le phénotype pathologique induit par l'Ang II.

### **1.3.4 Résumé du rôle de l'Ang II sur le système cardiovasculaire**

En résumé, l'Ang II peut entraîner le remodelage du tissu cardiaque de façon indirecte ou directe. L'augmentation de la pression sanguine par l'angiotensine II cause des changements au niveau du tissu cardiaque. Ces changements visent à compenser les modifications survenant au niveau du système cardiovasculaire mais ultimement, vont conduire à une perte de la fonction cardiaque (décompensation). L'activation des récepteurs AT1 au niveau des cardiomyocytes est également directement reliée au remodelage tissulaire. Plusieurs études ont suggéré que l'Ang II pourrait aussi réguler directement les courants ioniques et induire des arythmies. Toutefois, la plupart de ces études utilisaient des modèles avec du remodelage cardiaque ou utilisaient des moyens indirects (comme l'usage de bloqueurs) pour montrer le rôle du SRAA dans le développement d'arythmies.

### **1.3.5 La souris transgénique AT1R**

Afin d'étudier les effets directs de l'Ang II au niveau cardiaque, une souris transgénique surexprimant le récepteur de type 1 de l'Ang II spécifiquement au niveau cardiaque, la souris AT1R, a été créée dans le laboratoire du Dr Mona Nemer à l'Institut de Recherche Clinique de Montréal.<sup>121</sup> Le gène du récepteur AT1 humain a été inséré au niveau du promoteur de la chaîne lourde de myosin  $\alpha$  dans le génome de souris de la lignée C57BL/6. Ce promoteur se situe spécifiquement dans les cardiomyocytes et induit la transcription constante des gènes sous son contrôle, ce qui cause l'expression continue et accrue du récepteur AT1 dans les cardiomyocytes.

L'expression accrue du récepteur AT1 dans les cœurs des souris augmente l'activation des voies de signalisation associées avec ce récepteur. Une étude a montré que l'augmentation de l'activation des cascades de signalisation associées du récepteur AT1

dans ce modèle de souris transgénique est responsable des effets observés.<sup>153</sup> Lors d'études préliminaires, le groupe du Dr Nemer a observé que l'administration d'Ang II à des concentrations inférieures aux doses nécessaires pour induire une augmentation de la pression sanguine était suffisante pour produire une augmentation de la masse du ventricule gauche et la mort subite chez les souris AT1R. Le groupe de Hein<sup>153</sup> a aussi observé que le traitement des souris AT1R nouveau-nées avec un IECA ou un ARA améliore la survie de ces souris. Ces études montrent que les récepteurs AT1 surexprimés au niveau cardiaque chez les souris AT1R sont fonctionnels, qu'ils régulent les effets causés par la liaison de l'Ang II et qu'ils sont responsables du phénotype pathologique cardiaque observés chez ces souris.

La souris AT1R ne présente pas de modification hémodynamique, ni d'hypertension.<sup>121</sup> Au niveau cardiaque, ces souris développent de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque.<sup>121</sup> Au stade avancé de la maladie, les souris AT1R présentent une cardiomyopathie globale (atteinte des quatre chambres cardiaques), une augmentation du poids des poumons et plusieurs ont de l'épanchement pleural, signes d'hypertension pulmonaire secondaire à l'atteinte majeure du ventricule gauche. Les souris AT1R meurent prématurément, à environ 6 mois. Des études préliminaires effectuées dans le laboratoire du Dr Céline Fiset ont montré que les souris AT1R avaient une incidence accrue d'arythmies. Ces données laissent croire que la surexpression du récepteur AT1 au niveau cardiaque pourrait influencer l'excitabilité cardiaque et augmenter les risques d'arythmies. Ces arythmies pourraient jouer un rôle important dans les décès précoces de ces souris. La souris AT1R, surexprimant le récepteur de type 1 de l'angiotensine II au niveau cardiaque représente un modèle *in vivo* intéressant pour étudier les effets de l'Ang II (médiés par les récepteurs AT1) sur la régulation de différents phénomènes cardiaques.



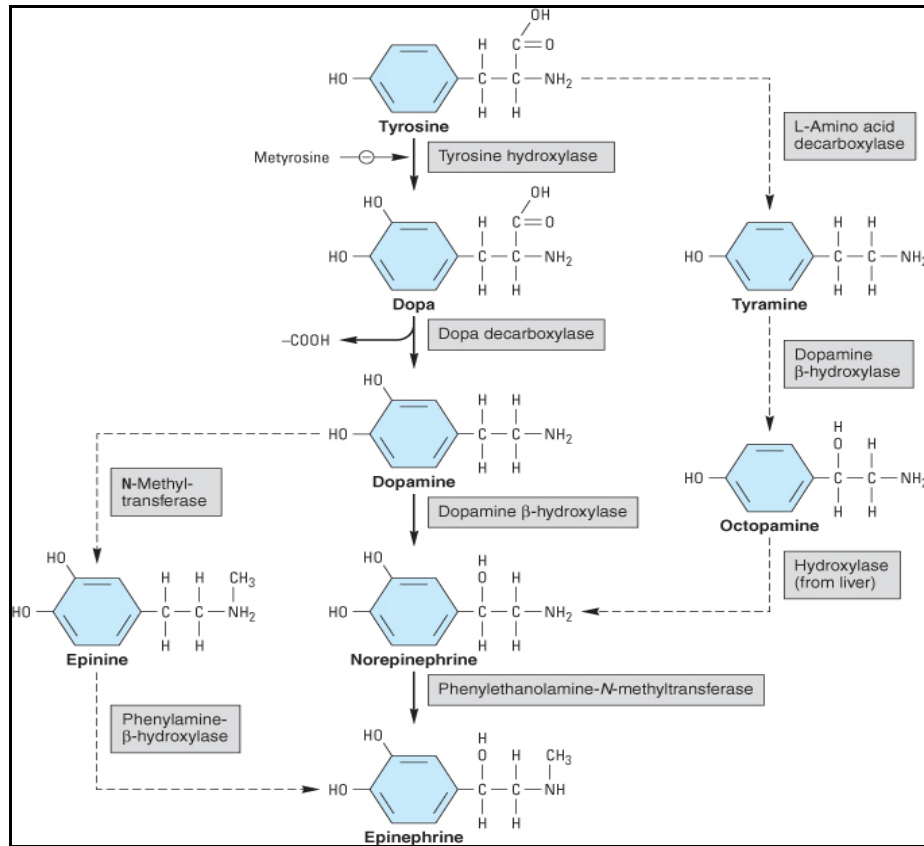
## **1.4 Le système adrénergique**

### **1.4.1 Introduction au système adrénergique**

Le système adrénergique fait partie du système nerveux autonome qui a pour rôle le contrôle de plusieurs fonctions physiologiques et pathologiques dans plusieurs organes, comme le cœur, les poumons, les vaisseaux sanguins, les intestins, la peau, les pupilles, etc. Au niveau cardiaque, le système adrénergique contrôle le rythme cardiaque et la force de contraction afin d'adapter le débit sanguin aux différentes situations et de perfuser adéquatement l'organisme selon les besoins.<sup>2</sup> Les principaux effecteurs physiologiques du système adrénergique sont les catécholamines, comprenant l'épinéphrine et la norépinéphrine qui lient les différents récepteurs adrénergiques pour produire leurs effets. Les récepteurs adrénergiques sont divisés en différents types et sous-types de récepteurs qui ont plusieurs fonctions dépendamment de leur localisation et des agonistes qui peuvent les activer.<sup>166</sup> Le système adrénergique, qui régule une multitude de fonctions du corps, peut lui-même être régulé par différents facteurs physiologiques ou pathologiques tels que l'âge et l'insuffisance cardiaque. Ces facteurs peuvent moduler la relâche des ligands, leur expression ou l'activation des récepteurs.

### **1.4.2 La synthèse des catécholamines**

Les catécholamines, l'épinéphrine et la norépinéphrine, sont les principaux ligands physiologiques des récepteurs adrénergiques. Les catécholamines agissent premièrement comme neurotransmetteurs au niveau des synapses du système nerveux et aussi comme neurohormones dans plusieurs organes puisqu'ils sont produits au niveau de la médullosurrénale et relâchés dans la circulation sanguine pour agir sur les organes cibles. L'épinéphrine et la norépinéphrine sont synthétisés suite à plusieurs transformations enzymatiques à partir de la tyrosine (Figure 1.12).



**Figure 1.12 Les différentes étapes de la synthèse des catécholamines** (tirée de <sup>166</sup>). La synthèse de la norépinéphrine et de l'épinéphrine se fait en plusieurs étapes. L'hydroxylation de la tyrosine représente l'étape limitante.

Ces enzymes ne sont pas spécifiques à la production des catécholamines et l'hydroxylation de la tyrosine représente l'étape limitante à la synthèse des catécholamines. La tyrosine hydroxylase est activée suite à la stimulation du système nerveux ou de la médullosurrénale et mène à la production des différents agonistes. Dans les neurones post-ganglionnaires du système nerveux sympathique, la norépinéphrine est le produit final entreposé dans les vésicules et est relâchée lors de la stimulation nerveuse. Au niveau de la médullosurénale, la norépinéphrine est transformée en épinéphrine avant d'être relâchée dans la circulation pour produire son effet.

### 1.4.3 Les récepteurs adrénergiques

#### 1.4.3.1 Les différentes catégories de récepteurs adrénergiques

Les récepteurs adrénergiques sont des récepteurs membranaires qui répondent et s'activent par leur liaison aux agonistes adrénergiques physiologiques, l'épinéphrine et la norépinéphrine, et pharmacologiques tels que la phényléphrine, la clonidine ou l'isoprotérénol. Il existe deux grandes catégories de récepteurs adrénergiques, soient les récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques et les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Ces catégories ont été créées suite aux observations que les différents effecteurs adrénergiques (norépinéphrine, épinéphrine et isoprotérénol) pouvaient avoir plusieurs effets selon les tissus cibles et pouvaient même avoir des effets contraires dans un même tissu dépendamment de la concentration, du site d'action ou du composé utilisé. Les récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques et  $\beta$ -adrénergiques ont une sélectivité différente pour les agonistes. Ainsi, les récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques lient préférentiellement épinéphrine  $\geq$  norépinéphrine  $\gg$  isoprotérénol, alors que les  $\beta$ -adrénergiques lient isoprotérénol  $>$  épinéphrine  $\geq$  norépinéphrine. Les récepteurs  $\alpha$ - et  $\beta$ - adrénergiques se divisent en sous-catégories et on retrouve alors cinq grandes classes de récepteurs adrénergiques, soient les récepteurs  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  et les récepteurs  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$  qui ont été identifiés et caractérisés selon leurs différences de structure, leur localisation et leur sélectivité relative pour des composés physiologiques et pharmacologiques. Plusieurs antagonistes sont aussi relativement spécifiques pour les différents sous-type de récepteurs, comme le phénoxybenzamine qui bloque les récepteurs  $\alpha$  ou le propranolol qui inhibe spécifiquement les récepteurs  $\beta$ . L'utilisation de plusieurs de ces agonistes ou antagonistes pharmacologiques sert à l'étude de la fonction des différents types de récepteurs.<sup>29,167,168</sup>

En conditions physiologiques, on retrouve au niveau cardiaque les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques et  $\beta_1$ -adrénergiques. Ce sont surtout les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques qui sont responsables des effets des catécholamines sur le cœur.<sup>169,170</sup> L'activation des récepteurs  $\beta_1$  cardiaques augmente la force de contraction du cœur (inotrope positif), accélère le rythme cardiaque (chronotrope positif) et augmente la conduction et diminue la période réfractaire (effet dromotrope). Ainsi, l'activation des récepteurs  $\beta_1$  par les catécholamines va entraîner une augmentation de la fonction cardiaque. En conditions physiologiques, l'activation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques cardiaques produit aussi des effets inotrope positifs, mais ils sont négligeables comparativement à ceux des récepteurs  $\beta_1$ . Au cours du développement de certaines pathologies cardiaques telles que l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaques, la réponse des récepteurs  $\beta_1$  est diminuée et la régulation de la fonction cardiaque par l'activation de ces récepteurs est perturbée. Nous avons vu précédemment qu'au cours du remodelage cardiaque, une augmentation de l'activation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques au niveau cardiaque était observée. Cette augmentation sert à compenser la diminution de la réponse des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, mais peut à long terme causer du remodelage et affecter la fonction du cœur.<sup>171-173</sup> Le deuxième projet de recherche présenté dans cette thèse concerne les effets cardiaques de l'activation spécifique des récepteurs  $\alpha_{1B}$ -adrénergique en condition pathologique. Ainsi, les prochaines sections traiteront principalement de l'activité et la fonction de ce récepteur en conditions physiologiques et pathologiques.

#### **1.4.3.2 Les récepteurs $\alpha$ -adrénergiques**

Deux types de récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques ont été identifiées,  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ , qui comprennent chacun trois sous-types de récepteurs, soient les récepteurs  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  et  $\alpha_{1D}$  et les récepteurs  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  et  $\alpha_{2C}$ . Ces différents sous-types de récepteurs sont codés par des gènes différents et présentent une homologie de séquence d'acides aminés d'environ 75%.<sup>29</sup> Ils ont été caractérisés selon leur structure, leur distribution, le type de protéine G auquel ils

sont couplés, leur signalisation intracellulaire, leur régulation et leur fonction. Au niveau cardiaque, on retrouve seulement les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques.

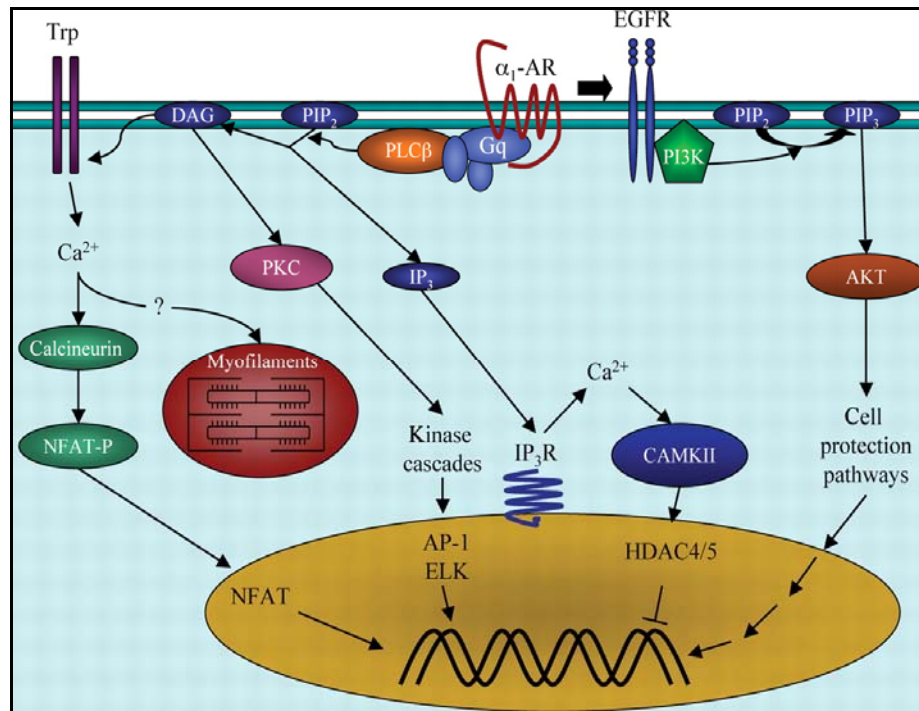
#### *1.4.3.2a La distribution des récepteurs $\alpha_1$ -adrénergiques*

Plusieurs tissus expriment les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques, tels que le cerveau, le foie, les reins, le cœur, les artères coronaires et les artères de gros calibre telles que l'aorte et l'artère pulmonaire.<sup>174,175</sup> Au niveau cardiaque, la plupart des mammifères incluant le rat (nouveau-né et adulte), la souris, le lapin, le cobaye, le chat, le hamster, l'agneau, le chien, le cochon, le singe et l'humain expriment les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques.<sup>168,176</sup> Au niveau des ventricules gauche et droit, l'humain a une densité de récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques plus petite que plusieurs espèces, incluant le rat, le cobaye, le lapin le cochon et la souris. Le cœur de rat exprime les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques à des niveaux au moins cinq fois plus élevés que toutes les autres espèces. La souris a une densité cardiaque de récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques plus petite que celle des rats qui se rapproche plus de celle de l'humain.<sup>168</sup> Les trois différents sous-types de récepteurs  $\alpha_1$ -AR,  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  et  $\alpha_{1D}$ , seraient exprimés dans plusieurs tissus, entre autres dans le cortex cérébrale, le foie, le cœur et les reins.<sup>175</sup> Les protéines des différents sous-types de récepteurs  $\alpha_1$ -arénergiques ont été mesurées dans plusieurs tissus chez les rats nouveau-nés et adultes.<sup>175</sup> Dans le cœur de rat, où les protéines de ces deux récepteurs sont exprimées en grande quantité, l'action d'un agoniste  $\alpha_1$  non-sélectif est médiée principalement par les récepteurs  $\alpha_{1A}$  et  $\alpha_{1B}$ . L'ARNm des trois sous-types de récepteurs  $\alpha_1$  a aussi été retrouvé au niveau cardiaque chez la souris.<sup>175</sup> Malgré que les niveaux d'ARNm de  $\alpha_{1A}$  soient plus importants que ceux de  $\alpha_{1B}$  dans les cœurs de souris, les niveaux protéiques de ce dernier sont plus grands.<sup>175</sup> Finalement, l'expression protéique de  $\alpha_{1D}$  est faible au niveau du muscle cardiaque<sup>175</sup> et il semble pas y avoir d'effets physiologiques importants.<sup>177</sup> Bien que l'on retrouve les sous-types  $\alpha_{1A}$  et  $\alpha_{1B}$  dans le tissu cardiaque, il semble que le récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénergique joue un rôle important dans

la régulation des effets physiologiques et pathologiques de l'activation des récepteurs  $\alpha_1$  au niveau cardiaque.<sup>63,171,178-180</sup>

#### *1.4.3.3b La structure et la signalisation intracellulaire des récepteurs $\alpha_1$ -adrénergiques*

Tous les récepteurs adrénérergiques sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (Figure 1.14). Les trois grands groupes de protéines G peuvent être associés avec un ou l'autre des sous-types de récepteurs adrénérergiques. Dépendamment de la protéine G impliquée, la cascade de signalisation intracellulaire activée sera reliée à l'activité de la phospholipase C ( $G_{\alpha q}$ ), à l'adénosine cyclase ( $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha i}$ ) ou indépendante des ces voies, par exemple via l'effet direct du complexe  $\beta\gamma$  de protéines G activées.<sup>167</sup> La signalisation intracellulaire principale associée avec l'activation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénérergiques est couplée à la protéine  $G_{q/11}$ .<sup>46,169</sup> Une fois activée par la liaison des catécholamines ou des agonistes au récepteur  $\alpha_1$ -adrénérergique, la sous-unité  $G_{\alpha q}$  active la phospholipase C, D ou A2 pour produire l' $IP_3$  et le DAG et augmente les concentrations de  $Ca^{2+}$  intracellulaire et l'activité de PKC. Plusieurs protéines pourront alors être directement ou indirectement régulées par l'activation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénérergiques, tels que les phospholipases, différents courants ioniques ( $I_{CaL}$ ,  $I_{to}$ ,  $I_K$ ), des transporteurs et des échangeurs membranaires (NCX, pompe  $Na^+/K^+$  ATPase) et l'expression de gènes.<sup>168</sup>



**Figure 1.13** Signalisation intracellulaire associée avec le couplage du récepteur  $\alpha_1$ -adrénergique avec la protéine Gq (tirée de <sup>173</sup>). (voir la liste des abréviations pour avoir plus de détails)

En plus de cette voie majeure de signalisation couplée à la protéine Gq, l'activation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques peut aussi réguler d'autres types de signalisation. Par exemple, la stimulation des récepteurs  $\alpha_1$  n'augmente pas la production d'AMPc, mais tend plutôt à la diminuer. Cette diminution pourrait être associée dans certaines conditions avec le couplage à la protéine Gi qui inhibe l'AC ou encore à l'augmentation de kinases couplées aux protéines G (GRK2, « G-protein-coupled receptor kinase 2 »).<sup>168</sup> Les voies de signalisation intracellulaires associées avec les récepteurs  $\alpha_1$  ne se limitent pas au couplage du récepteur avec les protéines G puisque les récepteurs  $\alpha_1$  activent, entre autres, des cascades de signalisation qui sont associées avec les tyrosines kinases. Certaines des protéines activées ont un lien avec la croissance et la prolifération cellulaire, telles que les

MAPK ou IP-3-kinase (« polyphosphoinositol-3-phosphate kinase ») et pourraient avoir un lien avec le remodelage et l'hypertrophie cardiaques.

Chez les souris surexprimant le récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénergique au niveau cardiaque, les niveaux de DAG sont augmentés, ce qui confirme l'activation de PLC par les récepteurs  $\alpha_{1B}$ .<sup>180</sup> De plus, chez ces souris surexprimant le récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénergique de type natif, l'activité de l'AC est diminuée, ce qui suggère que ce récepteur peut aussi être couplé avec  $G_i$  pour réguler l'AC.

#### **1.4.4 Effets cardiaques des récepteurs $\alpha_1$ -adrénergiques**

##### **1.4.4.1 Contribution des récepteurs $\alpha_1$ -adrénergiques au niveau cardiaque**

Au niveau du cœur, on retrouve principalement les récepteurs  $\beta_1$ - et  $\alpha_1$ -adrénergiques. Malgré que les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques sont exprimés dans les ventricules et les fibres de Purkinje, leurs effets dans ces tissus en conditions physiologiques sont plutôt minimes comparés à ceux des récepteurs  $\beta$ .<sup>169,170</sup> Toutefois, en conditions pathologiques, par exemple lors de l'ischémie ou du remodelage cardiaque, la réponse des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques diminue et l'expression et l'activité des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques augmentent.<sup>171,172</sup> Les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques auraient alors un rôle compensatoire pour maintenir la fonction cardiaque, spécialement lorsque la réponse des récepteur  $\beta$  est perturbée.<sup>173</sup> L'augmentation de l'activation de la voie de signalisation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques pourrait contribuer au développement de la pathologie ou à l'exacerbation de la condition pathologique. L'activation des récepteurs  $\alpha_1$  par les catécholamines a plusieurs actions sur l'ensemble du système cardiovasculaire telles que la vasoconstriction, la contraction cardiaque, l'hypertrophie, la régulation du métabolisme et le remodelage. Plus particulièrement au niveau du cœur, la stimulation des  $\alpha_1$ -AR augmente la force de contraction, prolonge la période réfractaire et diminue l'automaticité



des fibres de Purkinje et prolonge la repolarisation des cardiomyocytes.<sup>181</sup> Mais ces effets physiologiques sur le cœur sont assez minimes comparativement à ceux des récepteurs  $\beta$ .

#### 1.4.4.2 Implication des récepteurs $\alpha_1$ -adrénergiques dans le remodelage cardiaque

Certaines conditions physiologiques nécessitent que le cœur subisse une augmentation de sa taille (appelée hypertrophie physiologique), par exemple au cours du développement et de la croissance (eutrophie) ou suite à l'activité physique. Les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques semblent participer à cette hypertrophie physiologique puisque les souris transgéniques ayant une délétion des gènes pour les récepteurs  $\alpha_{1A}$  et  $\alpha_{1B}$  (la souris ABKO) ont des cœurs plus petits que les souris de type sauvage.<sup>182</sup> De plus, en conditions pathologiques, une trop grande stimulation des récepteurs  $\alpha$  peut être associée au développement de l'hypertrophie pathologique et de l'insuffisance cardiaque. Les différents paramètres caractérisant l'hypertrophie cardiaque sont l'augmentation de la taille des cellules, l'augmentation de la quantité de protéines et la réexpression du profil foetal de certains gènes (voir section 1.2). Plusieurs études ont montré que les catécholamines induisent l'hypertrophie en augmentant la synthèse de protéines<sup>29-31,33</sup> et en stimulant l'expression de certains gènes associés avec le développement de l'hypertrophie, comme c-myc, c-fos, Egr-1, ANP, MLC-2 et  $\alpha$ -actine.<sup>30,31,33,46</sup> La stimulation spécifique des récepteurs  $\alpha_1$  par la phényléphrine induit l'hypertrophie des myocytes de rats nouveau-nés observée par une augmentation de la taille des myocytes, une altération de l'organisation des myofilaments et une augmentation de l'expression de l'ANF. Ces changements seraient médiés par la protéine Gq et RAS.<sup>30,46,183,184</sup> L'activation des récepteurs  $\alpha_1$ , associée à l'activation des protéines Gq, stimule la protéine kinase C (PKC) qui a des effets sur la croissance et la prolifération cellulaire et serait impliquée dans le développement de l'hypertrophie.<sup>46,169</sup> Les différents sous-types de récepteurs  $\alpha_1$ -AR jouent des rôles distincts dans le développement de l'hypertrophie et du remodelage cardiaques. Une étude a montré que des stimuli reconnus pour induire l'hypertrophie, tels que l'endothéline ou les

prostaglandines augmentent l'expression du récepteur  $\alpha_{1A}$ , mais diminuent celle de  $\alpha_{1B}$  et de  $\alpha_{1D}$ .<sup>183</sup> De plus, l'inhibition spécifique du récepteur  $\alpha_{1A}$ -adrénergique par WB-4101 inhibe presque entièrement la synthèse protéique induite par la stimulation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques. D'un autre côté, les souris surexprimant le récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénergique constitutivement actif ont une augmentation de la taille du cœur (hypertrophie) et une augmentation de l'expression de l'ANP.<sup>185</sup> Toutefois, les souris surexprimant la forme native du récepteur  $\alpha_{1B}$  (avec des niveaux d'expression 40 fois plus élevés que la normale) présentent plutôt un phénotype de cardiomyopathie dilatée associée à une diminution de la fonction cardiaque sans toutefois présentées d'hypertrophie.<sup>178,180</sup> Finalement, l'inactivation du récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénergique n'inhibe pas la réponse hypertrophique. Ces résultats suggèrent que le récepteur  $\alpha_{1B}$ , sous sa forme native, n'est pas impliqué dans le développement de l'hypertrophie. Ce serait le sous-type  $\alpha_{1A}$ , par l'activation de petite protéine G de la famille des Ras<sup>33</sup> qui serait responsable de la réponse hypertrophique induite par la stimulation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques. Malgré tout, le récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénergique serait impliqué dans le remodelage menant à l'insuffisance cardiaque puisque les souris  $\alpha_{1B}$ -AR (forme native) développent de l'insuffisance cardiaque associée plutôt avec un phénotype de cardiomyopathie dilatée.<sup>179,180</sup>

#### 1.4.4.3 Effet de l'activation des récepteurs $\alpha_1$ -adrénergiques sur la contraction

Les agonistes des récepteurs  $\alpha_1$ -AR augmentent la contraction sans affecter le rythme cardiaque. L'administration de phényléphrine (agoniste non sélectif  $\alpha_1$ -AR), en présence de propranolol (antagoniste des récepteurs  $\beta$ ), produit un effet inotrope positif. Toutefois, cette réponse inotrope positive induite par la stimulation des récepteurs  $\alpha_1$  est beaucoup moins importante que celle induite par les récepteurs  $\beta$ .<sup>186</sup> Malgré la grande différence de l'intensité de la réponse produite par les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$ , il semble que la présence des récepteurs  $\alpha_1$  soit nécessaire pour produire une contraction maximale puisque chez la souris n'exprimant pas les deux récepteurs  $\alpha_{1A}$  et  $\alpha_{1B}$  (la souris ABKO), la force de

contraction générée est plus faible que celle des souris de type sauvage.<sup>187</sup> L'effet inotrope positif serait principalement causé par (1) l'activation des PKC qui augmente la sensibilité des myofilaments pour le  $\text{Ca}^{2+}$  ainsi que l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule via les courants  $\text{Ca}^{2+}$  et (2) par la production d' $\text{IP}_3$  qui induit la relâche du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. L'activation des récepteurs  $\alpha_1$  augmente la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire ainsi que la sensibilité des myofilaments pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . Les récepteurs  $\alpha_{1A}$  et  $\alpha_{1B}$ , les deux principaux sous-types que l'on retrouve au niveau cardiaque, pourraient agir différemment pour induire la contraction. Il a été montré que la dihydropyridine, bloqueur des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type L, inhibe la contraction induite par l'activation du récepteur  $\alpha_{1A}$  mais pas celle induite par le récepteur  $\alpha_{1B}$  dans les muscles lisses. Ce résultat suggère que les récepteurs  $\alpha_{1A}$  agissent principalement sur les courants  $\text{Ca}^{2+}$  pour augmenter l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et favoriser la contraction, alors que les récepteurs  $\alpha_{1B}$  mobilisent le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire par l'action de l' $\text{IP}_3$ .<sup>177,186,188,189</sup> Selon ces études, les récepteurs  $\alpha_{1B}$  et  $\alpha_{1D}$  réguleraient la contraction principalement via les protéines  $\text{G}\alpha_q$  alors que le récepteur  $\alpha_{1A}$  agirait aussi via d'autres voies de signalisation. Chez le rat, qui exprime normalement les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques en grande quantité au niveau cardiaque, la réponse inotrope positive associée à ce récepteur serait produite principalement via les récepteurs  $\alpha_{1B}$ -adrénergiques.<sup>186</sup> Une autre étude a montré que les récepteurs  $\alpha_{1A}$  et  $\alpha_{1B}$  ont des effets opposés sur les mécanismes de régulation de la contraction cardiaque.<sup>188</sup> Dans cette étude, l'activation des récepteurs  $\alpha_{1A}$ -adrénergiques augmente la sensibilité des myofilaments pour le  $\text{Ca}^{2+}$  et augmente les transients calciques alors que les récepteurs  $\alpha_{1B}$  produisent l'effet inverse. La contradiction de cette dernière étude avec les autres pourrait venir du fait que pour étudier spécifiquement chacun des récepteurs, ces études utilisent plusieurs agents pharmacologiques dans des conditions expérimentales différentes. Toutefois, l'ensemble des études semblent d'accord pour conclure que les récepteurs  $\alpha_{1A}$  et  $\alpha_{1B}$  agissent différemment sur la contraction cardiaque. Il est donc probable que ces deux récepteurs agissent via des voies de signalisation différentes sur la contraction.

#### 1.4.4.4 Effet de l'activation des récepteurs $\alpha_1$ -adrénergiques sur les courants ioniques et l'incidence d'arythmies

Les catécholamines circulantes et la stimulation adrénergique peut induire et soutenir des tachycardies ou des fibrillations ventriculaires surtout dans un contexte d'ischémie du myocarde, de l'hypertrophie ou de l'insuffisance cardiaque. Le rôle des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques dans la genèse des arythmies a été précédemment observé et assez bien établi. Toutefois, les effets de l'activation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques sur la régulation des paramètres électrophysiologiques et la survenue d'arythmies a longtemps été négligés par rapport aux études faites sur les récepteurs  $\beta$ . Malgré tout, quelques études ont suggéré qu'en plus d'avoir des effets sur la contraction et le remodelage cardiaque, l'activation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques au niveau du myocarde affecte aussi les paramètres électrophysiologiques.

Certaines études ont montré que l'activation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques retarde la repolarisation des cardiomyocytes.<sup>87,184,190-192, 193</sup> Par exemple, l'activation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergique (par la phényléphrine) produit une prolongation du QT chez l'humain.<sup>193</sup> et une prolongation de la durée du potentiel d'action dans les myocytes ventriculaires de rat nouveau-nés.<sup>184</sup> Tel que discuté dans la section 1.1, le retard de repolarisation peut être causé par une augmentation des courants entrants ou par une diminution de courants sortants. Certaines études ont montré que l'activation des récepteurs  $\alpha_1$ -AR augmente le courant  $\text{Ca}^{2+}$  entrant, entre autres, en retardant l'inactivation du courant. Ces études suggèrent que cette augmentation des courants  $\text{Ca}^{2+}$  pourrait être en partie responsable du retard de repolarisation.<sup>181,194</sup> Toutefois, d'autres études ont montré que le traitement de cellules de rats nouveau-nés en culture avec la phényléphrine diminue l'expression de l'ARNm du canal calcique ainsi que la densité de  $\text{I}_{\text{CaL}}$ <sup>195</sup>, alors que l'agoniste  $\alpha_1$ -adrénergique n'a aucun effet sur le courant  $\text{Ca}^{2+}$  dans des cellules auriculaires de lapin.<sup>191</sup> La stimulation non-spécifique des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques produirait ainsi deux effets

opposés sur  $I_{CaL}$  dépendamment du sous-type de récepteur activé. L'activation des récepteurs  $\alpha_{1A}$  produirait un effet positif sur les courants  $I_{CaL}$  associé avec l'activation des PKC et de la CaMKII, alors que l'activation des récepteurs  $\alpha_{1B}$  inhiberait le courant calcique via l'action directe du complexe  $\beta\gamma$  de la protéine G sur le canal.<sup>177</sup> Ce qui confirme que les deux sous-types de récepteur  $\alpha_1$  agissent via des voies de signalisation différentes. Malgré toutes ces études sur les effets de l'activation des récepteurs  $\alpha_1$ -AR sur les  $I_{CaL}$ , le retard de repolarisation reste présent malgré l'administration d'un bloqueur de courants  $Ca^{2+}$  ce qui laisse croire que des changements dans la régulation des courants  $Ca^{2+}$  n'est pas responsable des troubles de repolarisation.<sup>190-192</sup> Le retard de repolarisation produit par l'activation des récepteurs  $\alpha$ -AR serait plutôt causé par une diminution des courants  $K^+$  sortants. Plusieurs études, surtout faites sur des cellules en culture ou des cellules perfusées avec des agonistes ou des antagonistes des récepteurs ont montré que les courants  $K^+$ , tels que  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$  et  $I_{Kr}$ , sont affectés par la stimulation des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques.<sup>87,92,181,191,192,196,197</sup> La plupart des études conclue que cette inhibition des courants  $K^+$  serait médiée via la signalisation DAG-PKC, donc via la protéine Gq.<sup>87,92,196,197</sup> Le retard de repolarisation produit par la diminution des courants  $K^+$  prolonge la fenêtre d'activation des courants  $Ca^{2+}$  et pourrait contribuer à faire entrer plus de  $Ca^{2+}$  dans la cellule et à augmenter la contraction induite par la stimulation des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques.<sup>192</sup> Toutefois, tel que discuté précédemment, le retard de repolarisation produit par cette diminution des courants  $K^+$  représente aussi un facteur de risque important à l'apparition d'arythmies.

Dans certaines conditions pathologiques, comme l'ischémie du muscle cardiaque, l'activation des récepteurs  $\alpha_{1A}$ -adrénergiques (par un agoniste  $\alpha$ ) augmente l'incidence de tachycardies et de fibrillations ventriculaires. Ce phénomène a été observé durant l'ischémie-reperfusion induite dans le myocarde de chien, de rat, de chat et de cobaye.<sup>198,199</sup> De plus, des bloqueurs des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques (la phentolamine et le prazosin) peuvent empêcher la survenue de ces arythmies dans un contexte d'ischémie.<sup>181</sup>

L'antagoniste spécifique des récepteurs  $\alpha_{1A}$  (WB 4101) diminue l'incidence d'arythmies causées par la phényléphrine lors de l'ischémie induite dans les fibres de Purkinje, alors que l'antagoniste des récepteurs  $\alpha_{1B}$ , le chloroéthylclonidine, ne semble pas empêcher aussi efficacement ces arythmies.<sup>200</sup> Ces résultats laissent croire qu'en conditions d'ischémie, ce serait surtout l'activation du récepteur  $\alpha_{1A}$  qui représente un facteur de risque au développement d'arythmies cardiaques.

#### **1.4.5 Résumé du rôle de l'activation des récepteurs $\alpha_1$ -adrénergiques au niveau cardiaque**

En résumé, les catécholamines lient les différents récepteurs adrénérergiques pour réguler plusieurs fonctions physiologiques et pathologiques. Au niveau cardiaque, on retrouve principalement les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques et les récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques. L'expression des récepteurs  $\alpha_1$  est augmentée en conditions pathologiques et cette augmentation de l'activité des récepteurs  $\alpha_1$  pourrait participer au développement de la pathologie cardiaque. Les récepteurs  $\alpha_1$ -AR sont impliqués dans le remodelage cardiaque, dans la régulation de la fonction cardiaque ainsi que dans la régulation des courants  $K^+$  et  $Ca^{2+}$  pouvant mener au développement d'arythmies. Les sous-types  $\alpha_{1A}$  et  $\alpha_{1B}$  ont des effets différents sur la régulation de ces différents phénomènes. Les études réalisées pour déterminer le rôle précis de chacun de ces récepteurs dans le phénotype pathologique cardiaque ont souvent été réalisées à l'aide d'agents pharmacologiques ou dans des modèles de remodelage cardiaque qui rendent certains résultats contradictoires et leur interprétation difficile.

#### **1.4.6 La souris transgénique $\alpha_{1B}$ -AR**

Les trois sous-types de récepteur  $\alpha_1$ -adrénergique, soit  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  et  $\alpha_{1D}$ , sont exprimés au niveau cardiaque, mais ce sont surtout  $\alpha_{1A}$  et  $\alpha_{1B}$  qui modulent la réponse  $\alpha$ -adrénergique. Cette réponse est variable d'un sous-type à l'autre dépendamment des seconds messagers

recrutés. L'utilisation d'agents pharmacologiques relativement spécifiques pour les trois sous-types de récepteurs qui a servi à montrer l'existence des trois catégories de récepteurs. Toutefois, peu d'agents pharmacologiques sont disponibles pour étudier spécifiquement le rôle de chacun des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques et différents modèles d'animaux transgéniques ont été créés afin de pouvoir caractériser la fonction de chacun des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques *in vivo*. Ainsi, des souris ayant une délétion des gènes pour les différents récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques ( $\alpha_{1A}$ -KO,  $\alpha_{1B}$ -KO,  $\alpha_{1D}$ -KO, et double knockout  $\alpha_{1AB}$ -KO et  $\alpha_{1BD}$ -KO) et d'autres surexprimant les récepteurs  $\alpha_{1A}$ -AR ou  $\alpha_{1B}$ -AR (au niveau cardiaque ou dans plusieurs tissus) ont été créées et ont permis de mieux comprendre les rôles de ces récepteurs.

Il existe deux modèles de souris surexprimant le récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénergique au niveau cardiaque, soient un modèle avec le récepteur constitutivement actif et le second avec le récepteur natif. Ces deux modèles présentent deux phénotypes cardiaques différents. Les souris exprimant le récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénergique constitutivement actif développent de l'hypertrophie et un phénotype pathologique plus sévère que les souris  $\alpha_{1B}$ -AR surexprimant le récepteur natif. Ces dernières développent plutôt un phénotype cardiaque comparable à la cardiomyopathie dilatée. Nous nous sommes intéressés au modèle de surexpression cardiaque du récepteur  $\alpha_{1B}$ -AR « natif », puisqu'il représente mieux les effets d'une suractivation de la voie de signalisation du récepteur  $\alpha_{1B}$  au niveau du cœur. Comme pour la souris transgénique AT1R, la surexpression spécifique au cœur est dirigée grâce au promoteur de la chaîne lourde de la myosine.<sup>180</sup> Le profil pathologique des souris  $\alpha_{1B}$ -AR (natif), semblable à la cardiomyopathie dilatée, est associé à un élargissement des quatre chambres cardiaques et à une perte graduelle de la fonction systolique progressant vers l'insuffisance cardiaque et la mort prématurée (vers 9 mois).<sup>179</sup> Le poids des cœurs augmentent seulement en phase terminale de la maladie, ce qui suggèrent un profil d'hypertrophie eccentric<sup>179</sup> (caractérisée par une dilatation et un allongement des myocytes avec un ajout des sarcomères en série), comparativement à une hypertrophie concentrique (augmentation de la taille des myocytes, épaissement des

paroi du ventricule) observée chez les souris AT1R. Au niveau, moléculaire, ces changements sont accompagnés d'une activation de la PLC,<sup>180</sup> d'une augmentation de DAG,<sup>180</sup> d'une augmentation de ERK,<sup>201</sup> de perturbations dans l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (SERCA2a, PLB)<sup>179</sup> et de la réactivation du profil de réexpression fœtal.<sup>179</sup> L'apparition de ce phénotype pathologique cardiaque chez les souris  $\alpha_{1B}$ -AR montre que l'activation accrue et persistente de la voie de signalisation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques, et plus précisément celle des  $\alpha_{1B}$ -AR, au niveau cardiaque est suffisante pour affecter gravement la fonction cardiaque et mener à la mort. Puisque plusieurs paramètres électrophysiologiques sont affectés lors du remodelage cardiaque et que l'activation du système adrénergique est un des changements observés chez les modèles animales expérimentaux et les humains atteints d'insuffisance cardiaque, il serait intéressant de caractériser la repolarisation ventriculaire de ces animaux afin de voir comment l'augmentation de l'activité des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques peut représenter un facteur de risque à la survenue d'arythmies.



## 1.5 Résumé de l'état des connaissances, buts de la thèse

Les cardiomyopathies hypertrophiques et les cardiomyopathies dilatées sont les deux formes d'atteinte du muscle cardiaque les plus communes. L'hypertrophie et le remodelage cardiaque sont associés avec un retard de repolarisation et à une plus grande incidence d'arythmies. Aux cours du développement de la cardiomyopathie, le système nerveux sympathique et le système rénine-angiotensine-aldostérone sont activés comme mécanismes compensatoires afin de maintenir la fonction cardiovasculaire normale. Toutefois, la stimulation excessive de ces systèmes modifie le phénotype cardiaque et favorise la détérioration de la fonction du cœur. De plus, le système adrénergique et le système rénine-angiotensine-aldostérone sont tous deux associés avec la régulation des courants ioniques et à l'apparition d'arythmies. Ce qui laisse croire qu'en plus d'être reliés avec l'hypertrophie et le remodelage cardiaque, ces deux systèmes pourraient aussi être responsables du développement d'arythmies chez les patients souffrant de remodelage et d'insuffisance cardiaques.

Deux modèles de souris transgéniques ont été développées afin d'étudier les effets spécifiques de la stimulation des récepteurs de type 1 de l'Ang II (la souris AT1R) et des récepteurs  $\alpha_{1B}$ -adrénergiques natif (la souris  $\alpha_{1B}$ -AR). Ces deux modèles de souris surexpriment spécifiquement au niveau cardiaque les récepteurs de deux systèmes impliqués dans le remodelage cardiaque sans présenter de modification hémodynamique. Les souris AT1R et  $\alpha_{1B}$ -AR présentent deux phénotypes pathologiques différents, soit une cardiomyopathie hypertrophique pour les AT1R et une cardiomyopathie dilatée pour les  $\alpha_{1B}$ -AR. Des études préliminaires ont révélées que les souris AT1R et les souris  $\alpha_{1B}$ -AR présentaient du remodelage cardiaque et avaient des arythmies ainsi qu'une prolongation de la durée du potentiel d'action. Au stade avancé de la maladie, les deux groupes de souris transgéniques souffrent d'insuffisance cardiaque et meurent subitement et prématurément, ce qui laisse croire que l'activation des deux récepteurs responsables du remodelage

cardiaque pourrait aussi affecter directement les paramètres électrophysiologiques et induire des arythmies pouvant être fatales.

Ainsi, l'**objectif général** de cette thèse de doctorat était de :

- Caractériser la repolarisation ventriculaire chez les souris AT1R et les souris  $\alpha_{1B}$ -AR afin de déterminer si l'activation excessive et chronique des voies de signalisation des récepteurs de type 1 de l'Ang II ou des récepteurs  $\alpha_{1B}$ -adrénergiques pouvait conduire à la survenue d'arythmies cardiaques.

Pour bien définir le rôle de chacun des stimuli dans le phénotype pathologique cardiaque nous avons établi les **objectifs spécifiques** suivant :

- 1) Déterminer si les troubles de repolarisation pouvant être observés chez ces deux modèles de souris transgéniques étaient associés au phénotype pathologique cardiaque ou si la surexpression de chacun des récepteurs en absence d'insuffisance ou d'hypertrophie peut suffire à produire le retard de repolarisation,
- 2) Comparer les résultats obtenus avec les deux modèles de souris transgéniques afin d'évaluer si les différences dans leur phénotype pathologique sont reliés avec des changements dans la régulation des paramètres électrophysiologiques

Afin de réaliser ces objectifs, des techniques d'électrophysiologie (patch-clamp, électrocardiogramme de surface, électrocardiogramme par télémétrie) et de biologie moléculaire (immunobuvardage de type western blot et PCR en temps réel) ont été combinées. Des échocardiographies ont été faits afin d'évaluer la condition pathologique des animaux.

Une première étude a été réalisée chez les souris AT1R mâles de deux groupes d'âge différents, soient à 50 jours (avant l'apparition de l'hypertrophie) et à 6-8 mois (stade avancé de la maladie). Cette étude a été publiée en 2008 dans le journal *Cardiovascular Research* et elle se retrouve au chapitre 2 de cette thèse. Une deuxième étude a été menée chez les souris  $\alpha_{1B}$ -AR mâles de deux groupes d'âge (2-3mois et 9-12 mois) correspondant, aux souris sans remodelage cardiaque et aux souris avec remodelage et insuffisance cardiaques. Les résultats de cette étude ont paru dans la revue *American Journal of Physiology (heart circ physiol)* en 2009 et elle est présentée au chapitre 3.

## **Chapitre 2**

### **Caractérisation de la repolarisation ventriculaire chez les souris surexprimant le récepteur de type 1 de l'angiotensine II au niveau cardiaque**

## 2.1 Avant propos

### 2.1.1 Introduction

L'angiotensine II (Ang II) est le peptide vasoactif du système rénine-angiotensine-aldostérone. L'Ang II joue plusieurs rôles physiologiques essentiels particulièrement dans le contrôle de la pression sanguine, mais il est aussi impliqué dans diverses pathologies telles que l'hypertension et l'insuffisance cardiaque. La majorité des effets physiologiques et pathologiques de l'Ang II sont médiés par l'activation du récepteur de type 1 de l'Ang II (AT1). Ainsi, l'Ang II peut agir directement au niveau du cœur via l'activation des récepteurs AT1 qui y sont exprimés ou indirectement via des changements hémodynamiques qui affectent la pression sanguine et activent les mécanismes de compensation au niveau du cœur. Afin d'étudier les effets spécifiques de l'Ang II sur le cœur, un modèle de souris transgénique surexprimant le récepteur AT1 seulement au niveau cardiaque (la souris AT1R) a été développé dans le laboratoire du Dr Mona Nemer. Suite à l'activation accrue et chronique du récepteur AT1, ces souris développent de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque sans avoir de changement hémodynamique. Des études préliminaires ont montré que les souris AT1R mourraient de façon prématurée; ce qui suggère qu'en conditions pathologiques, l'Ang II pourrait contribuer à la mort subite en favorisant l'apparition d'arythmies cardiaques. Par ailleurs, un retard de repolarisation ventriculaire, observé par une prolongation de la durée du potentiel d'action et de l'intervalle QTc, représente un facteur de risque important au développement d'arythmies cardiaques. De plus, les courants potassiques sont les principaux responsables de la repolarisation des cardiomyocytes.

Puisque les souris AT1R meurent prématurément et de façon spontanée, nous avons voulu étudier la repolarisation ventriculaire de ces souris afin de voir si l'activation du

récepteur AT1 au niveau cardiaque pouvait affecter directement la repolarisation et causer des arythmies et la mort de ces souris. Ainsi, nous avons isolé des cardiomyocytes ventriculaires des souris mâles AT1R et contrôles pour enregistrer et mesurer les courants  $K^+$  présents au niveau ventriculaire chez la souris (soient  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$ ,  $I_{ss}$  et  $I_{K1}$ ) par des techniques de patch clamp en configuration « cellule entière » et en mode « voltage clamp » ainsi que les potentiels d'action (mode « current clamp »). Les niveaux d'expression protéique et d'ARNm des canaux  $K^+$  responsables des différents courants  $K^+$  ont été mesurés par immunobuvardage de type Western Blot et PCR en temps réel. Nous avons aussi enregistré des ECG de surface pour mesurer l'intervalle QT et calculer le QTc (le QT corrigé selon le rythme cardiaque). Nous avons utilisé la télémétrie pour enregistrer des ECG en continu sans administration d'anesthésiant et évaluer l'incidence d'arythmies spontanées. Finalement, nous avons fait des échocardiographies afin d'évaluer la condition pathologique cardiaque des souris transgéniques au moment où nous les avons utilisées pour l'étude de la repolarisation. Toutes ces techniques ont été faites chez les souris mâles AT1R et contrôles de deux groupes d'âge différents, soient 6-8 mois (avec de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque) et  $50 \pm 5$  jours (sans hypertrophie) afin de différencier les effets directs de l'activation des récepteurs AT1 de ceux qui pourraient être secondaires au remodelage cardiaque.

### 2.1.2 Contribution des auteurs

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <b>Katy Rivard :</b>    | Stratégie expérimentale, expérimentation, analyse, rédaction |
| <b>Pierre Paradis :</b> | Collaborateur, création du modèle de souris AT1R, conseils   |
| <b>Mona Nemer :</b>     | Collaborateur, création du modèle de souris AT1R, conseils   |
| <b>Céline Fiset :</b>   | Conceptualisation du projet, supervision, rédaction finale   |

## 2.2 Article

*Cardiovascular Research* **78** (2008) 53-62

### **CARDIAC-SPECIFIC OVEREXPRESSION OF THE HUMAN TYPE 1 ANGIOTENSIN II RECEPTOR CAUSES DELAYED REPOLARIZATION**

Katy Rivard,<sup>1,2</sup> Pierre Paradis,<sup>3,4</sup> Mona Nemer<sup>3,5</sup> and Céline Fiset<sup>1,2†</sup>

<sup>1</sup>Research Centre, Montreal Heart Institute

<sup>2</sup>Faculty of Pharmacy, Université de Montréal

<sup>3</sup>Institut de Recherche Clinique de Montréal

<sup>4</sup>Present address: Lady Davis Institute for Medical Research, Jewish General Hospital, Montreal

<sup>5</sup>University of Ottawa

Running title: Repolarization defect in mutant AT1R mice

## 2.2.1 Résumé / Abstract

### 2.2.1.1 Résumé

**Objectif:** Les souris surexprimant le récepteur de type 1 de l'angiotensine II humain (AT1R) présentent du remodelage cardiaque et meurent subitement et prématurément. Puisque la prolongation excessive de l'intervalle QT est un facteur de risque important au développement d'arythmies ventriculaires et à la mort subite, nous avons émis l'hypothèse que la stimulation chronique de AT1R pourrait contribuer à la mort subite en favorisant un retard de repolarisation et le développement d'arythmies ventriculaires. **Méthodes :** Dans cette étude, nous avons analysé différents paramètres de repolarisation ventriculaire chez les souris AT1R. **Résultats :** L'enregistrement des courants  $K^+$  dans les myocytes ventriculaires des souris AT1R mâles a révélé une réduction significative du courant  $K^+$  transitoire sortant indépendant du  $Ca^{2+}$  ( $I_{to}$ ), du courant  $K^+$  à rectification retardée ultrarapide ( $I_{Kur}$ ) et du courant  $K^+$  à rectification entrante ( $I_{K1}$ ) comparativement aux contrôles (CTL). L'expression des canaux  $K^+$  responsables de ces courants était aussi diminuée dans les ventricules des AT1R. De plus, la réactivation de  $I_{to}$  était plus lente chez les souris AT1R. Conformément à ces résultats, les souris AT1R ont une prolongation de la durée du potentiel d'action ( $APD_{90}$ , CTL:  $19.0 \pm 1.8$  ms; AT1R:  $39.1 \pm 4.7$  ms,  $p=0.0001$ ) et de l'intervalle QTc (CTL:  $53.6 \pm 1.5$  ms, AT1R:  $64.2 \pm 1.4$  ms,  $p=0.0005$ ). Aussi, des arythmies ventriculaires spontanées ont été enregistrées chez les souris AT1R. Finalement, la plus grande incidence d'arythmies ainsi que les troubles de repolarisation surviennent aussi chez les souris AT1R plus jeunes, qui ne présentent pas de signes d'hypertrophie, confirmant que ces troubles ne sont pas secondaires au remodelage cardiaque. **Conclusion:** Ces résultats suggèrent fortement que la stimulation chronique des AT1R augmente directement l'incidence d'arythmies associées à un retard de repolarisation.

**Mots clés:** Angiotensine II, courants  $K^+$ , repolarisation ventriculaire, arythmies, souris transgéniques.



### 2.2.1.2 Abstract

**Aim:** Mice with cardiac specific overexpression of human angiotensin II type 1 receptor (AT1R) undergo cardiac remodeling and die prematurely of sudden death. Since excessive QT prolongation is a major risk factor for ventricular arrhythmias and sudden death, we hypothesize that chronic stimulation of AT1R might contribute to sudden death by promoting delayed repolarization and ventricular arrhythmias. **Methods:** In the present study, a detailed analysis of ventricular repolarization parameters was undertaken in AT1R mice. **Results:** Measurement of  $K^+$  currents in ventricular myocytes isolated from 6-8 months AT1R male mice revealed a significant reduction of the  $Ca^{2+}$ -independent transient outward ( $I_{to}$ ), the ultrarapid delayed rectifier ( $I_{Kur}$ ) and the inward rectifier ( $I_{K1}$ )  $K^+$  currents compared to littermate controls (CTL). The expression of the underlying  $K^+$  channels was also decreased in AT1R ventricles. Moreover, reactivation of  $I_{to}$  was slower in AT1R mice. Consistent with these findings, AT1R mice presented longer action potential duration ( $APD_{90}$ , CTL:  $19.0 \pm 1.8$  ms; AT1R:  $39.1 \pm 4.7$  ms,  $p=0.0001$ ) and QTc interval (CTL:  $53.6 \pm 1.5$  ms, AT1R:  $64.2 \pm 1.4$  ms,  $p=0.0005$ ). In addition, spontaneous ventricular arrhythmias were reported in the AT1R mice. Importantly, the increased incidence of arrhythmia and the repolarization defects also occurred in much younger AT1R mice that do not present signs of hypertrophy, confirming that these arrhythmogenic changes are not secondary to cardiac remodeling. **Conclusion:** These results strongly suggest that chronic stimulation of AT1R directly leads to an increased incidence of cardiac arrhythmia associated with delayed repolarization.

**Key words:** Angiotensin II,  $K^+$  currents, ventricular repolarization, arrhythmias, transgenic mice.

### 2.2.2 Introduction

Angiotensin II (ANG II), the active end product of the renin-angiotensin system (RAS), has numerous physiological effects on the cardiovascular system. Unfortunately, under pathological conditions the increased activity of RAS contributes to the development of ventricular hypertrophy and remodeling.<sup>1-5</sup> To date, most of the cardiac damaging effects of ANG II appear to be mediated by the ANG II type 1 receptor (AT1R).<sup>6</sup> Although it is well recognized that ANG II is involved in the initiation of cardiac remodeling,<sup>7-10</sup> relatively little is known concerning the role of ANG II in the higher propensity of lethal cardiac arrhythmias associated with heart disease.<sup>4,5,11</sup> Activity of the RAS appears to be able to alter repolarization in myocardium.<sup>12</sup> However, while transgenic mouse models with cardiac restricted overexpression of different components of the RAS have been instrumental in studying the role of ANG II in cardiac remodeling,<sup>10,13,14</sup> no detailed characterization of cardiac cellular excitability has been realized using these genetically manipulated mouse models. Thus far, only a small number of studies have documented an increased incidence of cardiac arrhythmias and sudden death in these transgenic mice.<sup>15-17</sup> Blockade of AT1R (AT1R antagonist, ARA) has been shown to decrease the arrhythmia morbidity in mice with ventricular hypertrophy.<sup>4</sup> In addition, angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI) have been reported to restore normal ventricular action potential duration (APD), refractoriness and reduced susceptibility to ventricular fibrillation.<sup>5</sup> Recently, using transgenic mice with cardiac-specific ANG II overproduction, Domenighetti *et al.* reported an increased incidence of ventricular arrhythmias and QT interval prolongation associated with a reduced density of inward rectifier K<sup>+</sup> current in mouse.<sup>13</sup> However, they did not examine any of the other K<sup>+</sup> currents/channels involved in mouse ventricular repolarization.<sup>13</sup>

Transgenic mice overexpressing the human ANG II type 1 receptors (AT1R) specifically in cardiomyocytes have been shown to develop hypertrophy and heart failure in the absence

of hypertension.<sup>10</sup> Moreover these AT1R mice die prematurely and spontaneously, suggesting that under pathological conditions, ANG II might contribute to cardiac sudden death by promoting severe cardiac arrhythmias. Since excessive QT prolongation, which reflects delayed repolarization, is a major risk factor for ventricular arrhythmias and sudden death, we conducted the present study to determine whether there was a causal relationship between chronic AT1R activation, delayed repolarization and cardiac arrhythmias. Findings presented here reveal that overexpression of the AT1R in the myocardium leads to delayed repolarization which could contribute to the increased incidence of cardiac arrhythmia.

### **2.2.3 Methods**

#### **2.2.3.1 Animals**

Experiments were performed on male C57BL/6 AT1R mice aged of either 6-8 months (6-8 mo) or 50±5 days. This transgenic mouse model overexpressing the human ANG II type 1 receptor (200-fold in the ventricles of the transgenic mice of both age groups) specifically in cardiomyocytes was described previously.<sup>10</sup> Heterozygous transgenic mice (AT1R) and age-matched wild-type littermates (CTL) were used. All experiments were conducted in accordance with the Canadian Council Animal Care guidelines and conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

A detailed description of all the following methods used in this study can be found in the online data supplement.

#### **2.2.3.2 Ventricular myocyte isolation**

The ventricular myocyte isolation protocol has been previously described.<sup>18</sup>

### 2.2.3.3 Electrophysiology

**Cellular electrophysiology.** All experiments were carried out at room temperature (20-22°C). The whole-cell voltage and current recording methods, data acquisition, voltage-clamp protocols and analysis methods have been described previously.<sup>19</sup>

**Surface ECG.** Mice were anaesthetized with isoflurane. Electrodes were placed subcutaneous and surface ECG were acquired in lead I configuration. The QT intervals were corrected (QTc) for the heart rate using the formula for mice ( $QTc = QT / (RR/100)^{1/2}$ ).<sup>20</sup>

**Telemetry recording.** Telemetry was used to record spontaneous ventricular arrhythmias in conscious free moving unanaesthetized CTL and AT1R mice. ECG lead placement represented lead II configuration.

### 2.2.3.4 Western blots analysis

Protocols used for isolation of sarcolemmal-enriched protein and Western blot analysis were identical to those previously reported.<sup>18,21</sup>

### 2.2.3.5 Real time PCR

RNA levels of the different K<sup>+</sup> channels (Kv1.5, Kv2.1, Kv4.2, KChIP2 and Kir2.1) were determined by real-time PCR as previously described.<sup>22</sup> mRNA expression was quantified relative to cyclophylin.

### 2.2.3.6 Echocardiography

Echocardiography was performed as previously described.<sup>23</sup> This was done to determine the left ventricular internal dimension in systole and diastole (LVIDs and LVIDd, respectively) and the fractional shortening (FS).

## Statistical analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. An unpaired Student t-test was used to compare means. P value  $< 0.05$  was considered significant.

## 2.2.4 Results

### 2.2.4.1 Alteration of $K^+$ currents in 6-8 mo AT1R mouse ventricular myocytes

Figure 1A shows that the total  $K^+$  current ( $I_{peak}$ ) was significantly smaller in AT1R myocytes compared to CTL cells (at +30 mV, CTL=  $68.1 \pm 9.2$  pA/pF and AT1R=  $28.2 \pm 4.6$  pA/pF;  $p=0.001$ ). The individual  $K^+$  conductance contributing to  $I_{peak}$  in mouse ventricular tissue were then compared. These  $K^+$  currents correspond to (1) the  $Ca^{2+}$ -independent transient outward ( $I_{to}$ ), (2) the ultra-rapid delayed rectifier ( $I_{Kur}$ ), (3) the steady-state outward ( $I_{ss}$ ) and (4) the inward rectifier ( $I_{K1}$ )  $K^+$  currents.<sup>19</sup> Mean current-voltage (I.-V.) relationships (Figure 1B) shows a significant decrease of  $I_{to}$  in AT1R cells compared to CTL myocytes (at +30 mV, CTL=  $31.9 \pm 3.9$  pA/pF and AT1R=  $9.8 \pm 1.4$  pA/pF;  $p=0.00004$ ). As shown in Figure 1C,  $I_{Kur}$  also was significantly decreased in AT1R mice (at +30 mV, CTL=  $27.3 \pm 5.5$  pA/pF and AT1R=  $9.8 \pm 1.4$  pA/pF;  $p=0.04$ ). In contrast, the third component of the outward  $K^+$  current,  $I_{ss}$ , was similar in both groups ( $p=NS$ ) (Figure 1D). Figures 1A and 1D also present data on  $I_{K1}$ . The inward portion of  $I_{K1}$  was significantly smaller in AT1R myocytes compared to CTL cells (at -110 mV, CTL=  $-21.3 \pm 1.2$  pA/pF and AT1R=  $-11.9 \pm 1.1$  pA/pF,  $p=0.00009$ ). The outward part of  $I_{K1}$  (-80 to -40 mV) was also significantly decreased in AT1R myocytes (at -60 mV, CTL=  $1.6 \pm 0.2$  pA/pF and AT1R=  $0.9 \pm 0.1$  pA/pF,  $p=0.003$ ).

Figure 2A compares the voltage-dependence of steady-state inactivation of  $I_{to}$  in CTL and AT1R ventricular myocytes. The right panel presents Boltzmann functions fitted to mean data. The steady-state inactivation of  $I_{to}$  was similar in both groups ( $V_{1/2}$ , CTL=  $-53.2 \pm 0.7$

mV; AT1R=  $-52.4 \pm 0.7$  mV,  $p = 0.3$ ; slope factor ( $k$ ), CTL=  $5.9 \pm 0.5$  mV; AT1R=  $7.3 \pm 0.8$  mV,  $p = 0.2$ ). Figure 2B shows the recovery from inactivation of  $I_{to}$  in AT1R mice. Examples of the family of currents that illustrate the time course of recovery at  $-80$  mV for CTL and AT1R myocytes are shown in the left panel. Recovery from inactivation was significantly slower in AT1R myocytes (time constant:  $79 \pm 7$  ms) compared to controls ( $34 \pm 2$  ms) ( $p = 0.000001$ ).

We also studied the steady-state inactivation and the recovery from inactivation of  $I_{Kur}$  in AT1R mice. The voltage dependence of steady-state inactivation of  $I_{Kur}$  was comparable in CTL ( $n = 12$ ) and AT1R ( $n = 6$ ) cardiomyocytes ( $V_{1/2}$ , CTL=  $-41.4 \pm 1.1$  mV and AT1R=  $-41.1 \pm 1.1$  mV,  $p = 0.9$ ;  $k$ , CTL=  $6.0 \pm 0.4$  mV and AT1R=  $6.2 \pm 1.0$  mV,  $p = 0.9$ ). Recovery from inactivation of  $I_{Kur}$  was also comparable in CTL and AT1R myocytes, with a time constant of  $552 \pm 59$  ms in CTL ( $n = 12$ ) and  $490 \pm 33$  ms in AT1R ( $n = 9$ ) ( $p = 0.4$ ). These results indicate that the reduced  $I_{Kur}$  density observed in AT1R ventricular myocytes cannot be explained by an alteration in  $I_{Kur}$  inactivation kinetic properties.

#### **2.2.4.2 Changes in $K^+$ channels expression in AT1R mouse ventricle**

Using Western blot analysis, we compared the protein expression levels of the  $K^+$  channels (Kv1.5, Kv2.1, Kv4.2/Kv4.3 and Kir2.1) corresponding to the murine ventricular  $K^+$  currents ( $I_{Kur}$ ,  $I_{ss}$ ,  $I_{to}$ , and  $I_{K1}$ , respectively).<sup>24-27</sup> In line with the electrophysiological data, protein expression of Kv1.5, Kv4.2 and Kir2.1 was decreased in AT1R ventricle compared to CTL (Figure 3A). However, Kv4.3 protein expression was similar in the two groups while Kv2.1 was increased in AT1R ventricle compared to controls.

To determine whether the changes observed in the protein level could be explained by transcriptional or post-transcriptional mechanisms, real-time PCR analysis was carried out on the  $K^+$  channel isoforms that exhibit differences at the protein level. Since both the density and voltage-dependent kinetics of recovery from inactivation of  $I_{to}$  also can be

influenced by the expression of the KChIP2 ancillary subunit, we also determined whether the transcript level of KChIP2 was affected by the AT1R overexpression. In support of a transcriptional regulation for Kv4.2 and KChIP2, the real-time PCR experiments revealed a significant reduction of Kv4.2 and KChIP2 mRNA transcripts in AT1R compared to CTL ventricles. In contrast, the mRNA levels for Kv1.5, Kv2.1 and Kir2.1 were similar between the two groups (Figure 3B), suggesting a post-transcription mechanism of regulation for these subunits.

#### **2.2.4.3 Physiological implication of the decrease of the K<sup>+</sup> currents in AT1R mice**

Consistent with the decrease of the K<sup>+</sup> currents in AT1R ventricles, APD were significantly longer in AT1R myocytes compared to those measured in CTL myocytes (in ms) (APD<sub>20</sub>, CTL= 2.5±0.2; AT1R= 4.3±0.3, p=0.00006), (APD<sub>50</sub>, CTL= 5.2±0.9; AT1R= 9.7±1.2, p=0.007), (APD<sub>90</sub>, CTL= 19.0±1.8; AT1R= 39.1±4.7, p=0.0005) (Figure 4A). Moreover, in keeping with the prolongation of the ventricular APDs, both QT and QTc intervals were significantly prolonged in AT1R compared to CTL mice (Figure 4B). However, heart rate was comparable between both groups. Of note, the QRS complex as well as the QRS corrected for the heart rate (QRSc) were significantly longer in the AT1R mice. However, even after subtracting the QRS (or QRSc) from the QT (or QTc), the prolongation was still statistically significant (respectively, p=0.02 and 0.01) (see figure 4B) confirming that the repolarization process is markedly delayed in the AT1R mice.

ECG recordings have been obtained using a telemetry system on free moving CTL and AT1R mice to determine whether the overexpression of the AT1R was associated with spontaneous arrhythmias. Figure 4C illustrates typical examples of ECG traces recorded from control (a) and AT1R (b-c) mice 6-8 months of age. While none of the 6 CTL mice experienced rhythm abnormalities, a mixture of spontaneous ventricular arrhythmias was observed in AT1R mice. The examples presented in Figure 4C illustrate different irregular rhythms observed in AT1R mutant mice: a polymorphic ventricular arrhythmia and a

normal sinus rhythm interrupted by episodes of irregular rhythm with wider QRS complexes. Similar arrhythmia episodes have been observed in 5 out of 6 AT1R mice. These arrhythmias were seen throughout the 24-hour recording period.

#### **2.2.4.4 Cardiac remodeling in 6-8 mo AT1R mice**

A common electrical alteration present in heart diseases is the prolongation of APD,<sup>28-30</sup> a known risk factor for severe ventricular arrhythmias. Thus, it was important to determine whether the arrhythmogenic changes described in the AT1R mice were the result of alterations in the context of cardiac remodeling or a direct consequence of chronic AT1 stimulation. To address this question, young adult mice (50±5 days) also were studied. We first examined cardiac structure and function of these AT1R mice. Results showed that compared to CTL, the 6-8-mo AT1R mice exhibit an increased left ventricular mass (LVmass) to body weight (BW) ratio (LVmass/BW (mg/g), CTL: 3.39±0.20; AT1R: 4.26±0.25; p=0.01) (Figure 5A). Cell capacitances (an indication of cell volume) of ventricular myocytes also were larger in AT1R mice (CTL: 162.8±8.5 pF; AT1R: 216.4±23.5 pF; p=0.01) (Figure 5B). Thus, these data indicate that the hearts from AT1R mice exhibit hypertrophy. Using ventricular internal dimensions in systole and diastole (determined by echocardiography), the FS was calculated. A significant reduction of this marker of cardiac function was observed in AT1R hearts (CTL: 55.6±0.9%; AT1R: 27.4±1.3%, p<0.00001) (Figure 5C,D). Taken together, these data demonstrate that there was clear evidence of both cardiac hypertrophy and failure in 6-8 mo AT1R mice.

#### **2.2.4.5 Ventricular repolarization defects and cardiac arrhythmias in younger AT1R mice**

To ascertain that the repolarization defects seen in AT1R mice were not secondary to cardiac hypertrophy or failure, we characterized ventricular repolarization in much younger AT1R mice (50±5 days) that have similar AT1R expression as 6-8 mo AT1R mice, but do not present cardiac remodeling. Capacitance of the ventricular myocytes of these young



AT1R mice was comparable to that of age-matched littermate controls (CTL:  $149.2 \pm 6.9$  pF,  $n=20$ ; AT1R:  $139.5 \pm 8.0$  pF,  $n=19$ ,  $p=0.4$ ) further confirming the absence of hypertrophy at the cellular level. Results presented in Figure 6 indicate that the younger transgenic mice exhibit a repolarization defect similar to that observed in the 6-8 mo AT1R mice. Indeed, compared to their age-matched controls, the 50 days AT1R mice had longer QTc interval (CTL:  $46.0 \pm 1.4$  ms; AT1R:  $56.9 \pm 2.1$  ms,  $p=0.0004$ ) and APD (APD<sub>20</sub>, CTL:  $2.2 \pm 0.1$  ms; AT1R:  $4.2 \pm 0.3$  ms,  $p<0.00005$ ), (APD<sub>50</sub> CTL:  $4.2 \pm 0.2$  ms; AT1R:  $12.1 \pm 1.4$  ms,  $p<0.00005$ ), (APD<sub>90</sub>, CTL:  $16.7 \pm 0.8$  ms; AT1R:  $34.9 \pm 3.1$  ms,  $p<0.00005$ ) (Figure 6 A,B). In addition, 50 days AT1R mice exhibited a decrease in density of the outward component of  $I_{\text{peak}}$  (at +30mV; CTL:  $64.2$  pA/pF and AT1R:  $28.4 \pm 3.1$  pA/pF,  $p<0.00001$ ). Of note, this reduction was similar to that observed in 6-8 mo AT1R mice (Figure 6C). Similar to what was seen in the older group, the 50 days AT1R mice also had a reduced density of  $I_{\text{to}}$  and  $I_{\text{Kur}}$  compared to their age-matched control counterparts (Figure 6D). However,  $I_{\text{ss}}$  was decreased in 50 days AT1R (at +30mV, CTL:  $14.8 \pm 0.7$  pA/pF and AT1R:  $11.3 \pm 0.8$  pA/pF,  $p=0.002$ ) but  $I_{\text{K1}}$  was similar (at -110mV, CTL=  $-19.7 \pm 1.4$  pA/pF and AT1R=  $-18.0 \pm 1.0$  pA/pF,  $p=0.3$ ).

Telemetry monitoring of young AT1R mice revealed that these electrophysiological defects were associated with a variety of spontaneous arrhythmias in 3 out of 3 young AT1R mice tested (data not shown). These arrhythmias were similar to those observed in the older AT1R animals. In contrast, no arrhythmias were observed in age-matched littermate CTL (0/4).

### 2.2.5 Discussion

The present work provides important new insight into the electrical remodeling that occurs as a consequence of chronic stimulation of myocardial AT1R. First, our results obtained in a mouse model of cardiac specific overexpression of human AT1R revealed the occurrence of ventricular arrhythmias and the electrophysiological consequences of AT1

overexpression. We found prolonged APD, delayed repolarization and alterations in several  $K^+$  currents/channels. Secondly, studies in younger mice, prior to the development of overt cellular hypertrophy, indicate that these electrical changes precede the anatomic disturbances, suggesting that the arrhythmogenic changes do not occur as a consequence of cardiac remodeling, but are directly associated with overstimulation of the AT1R. Thirdly, the electrophysiological alterations described here also occur independently of hemodynamic changes,<sup>10</sup> ruling out the involvement of peripheral vascular changes in the phenotype observed.

In both age groups, the QTc interval and APD were significantly prolonged in the AT1R mice. The  $K^+$  currents affected in the older AT1R mice were  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$  and  $I_{K1}$ , whereas those affected in the younger animals were  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$  and  $I_{ss}$ . The fact that  $I_{ss}$  was reduced in the 50 days AT1R mice implies that this current is affected by chronic stimulation of the AT1R. However, in the older group,  $I_{ss}$  was similar between CTL and AT1R mice. It is possible that the density of  $I_{ss}$  increases with time to compensate the reduction of the other outward  $K^+$  currents. Compensatory upregulation of Kv2.1 ( $I_{ss}$ ) has been reported in previous studies.<sup>31,32</sup> Indeed, following targeted replacement of Kv1.5, RNA and protein of Kv1.5 were undetectable and Kv2.1 protein was increased in a transgenic model of delayed repolarization.<sup>31,32</sup> In the present study, the increased Kv2.1 protein expression seen in the older AT1R mice also supports a time-dependent compensatory upregulation of Kv2.1. Furthermore, because  $I_{ss}$  does not contribute as much as  $I_{to}$  or  $I_{Kur}$  at the peak of the total  $K^+$  current, the difference in the density of  $I_{ss}$  in AT1R mice between 50 days and 6-8 mo mice is not sufficient to result in a significant change in the amplitude of  $I_{peak}$ .

The other noticeable difference between the younger and older AT1R mice relates to  $I_{K1}$ . In the 6-8 mo AT1R myocytes,  $I_{K1}$  was smaller compared to the controls. In contrast, in the younger AT1R mice,  $I_{K1}$  was not altered. The fact that younger and older AT1R mice display a similar density of AT1R implies that the difference between the two age groups is

not due to the degree of overexpression. In fact, the  $I_{K1}$  data strongly suggest that changes in the density of this  $K^+$  current in the older AT1R mice might result from alterations in intracellular signalling associated with cardiac hypertrophy and would not be directly due to the increase stimulation of AT1R. In a separate study, we observed that overexpression of wild type  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor ( $\alpha_{1B}$ -AR) in mice did not affect the density of  $I_{K1}$  (submitted manuscript, Rivard *et al.*, 2007). Of note, the late-onset heart failure phenotype observed in  $\alpha_{1B}$ -AR mice was not preceded by longstanding cardiac hypertrophy. Taken together these findings suggest that  $I_{K1}$  might be altered only in the presence of hypertrophy.

In a recent study, Domenighetti *et al.* studied 50-60 weeks transgenic mice with cardiac-specific ANG II overproduction. They reported that these mice develop hypertrophy associated with prolonged QT interval and APD. These observations were attributed to a decrease in  $I_{K1}$ ,<sup>13</sup> which was the only current examined in their study. A reduction of  $I_{K1}$  in that model of hypertrophy would agree with a relationship between downregulation of  $I_{K1}$  and the presence of cardiac remodeling. However, although they reported that the animals studied presented ventricular hypertrophy, they failed to establish a correlation between cell capacitance and the density of  $I_{K1}$ . Based on that observation, they concluded that the reduction of  $I_{K1}$  was independent of cell size and hypertrophy. However, to clearly establish the contribution of hypertrophy on  $I_{K1}$  density it would have been more informative to test younger animals that do not present signs of hypertrophy.

Results obtained in our expression studies indicate the chronic stimulation of the AT1R decreased  $I_{to}$  density and altered its kinetics of reactivation through alteration of Kv4.2 and KChIP2 transcription. However, Kv4.3 expression levels were unaffected in AT1R mice. We previously observed that overexpression of  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor in mouse heart also decreased  $I_{to}$ , Kv4.2 and KChIP2 without any effect on Kv4.3. Our expression studies also suggest that the decreased density of  $I_{Kur}$  and  $I_{K1}$  observed in the AT1R mice could be

explained by post-transcriptional regulation as suggested by decreased protein expression of Kv1.5 ( $I_{Kur}$ ) and Kir2.1 ( $I_{K1}$ ) without changes in the mRNA levels.

Fischer *et al.* have recently reported that hypertensive transgenic rats harboring the human renin and angiotensinogen genes developed cardiac damage leading to sudden death.<sup>33</sup> They also observed that ventricular tachycardia was common in these animals. Although, they did not have any cellular electrophysiological data, they used non-invasive cardiac magnetic field mapping to report that depolarization and repolarization were prolonged and inhomogeneous. These data are in strong support of the findings reported here. However, because of the presence of hypertension in that rat model, it is hard to determine whether the observed electrical remodeling occurs as a consequence of ANG II stimulation or results from hypertension.

Our results also are consistent with previous reports showing a relationship between ANG II and ionic currents. In vascular smooth muscle cells, ANG II has been shown to inhibit several  $K^+$  channels, including  $K_{ATP}$ ,  $B_{KCa}$ , and Kv channels.<sup>34,35,36</sup> Similarly, different groups have reported that cardiac  $K^+$  currents are attenuated after application of ANG II.<sup>37-39</sup> Furthermore, in some studies, the effects of ANG II on ionic currents could be reversed when the action of ANG II was blocked with ACEI or ARA.<sup>39</sup> Findings reported here also agree with previous reports showing beneficial effects of ACEI or ARA in preventing arrhythmic mortality.<sup>4,5</sup>

The primary objective of the telemetry experiments was to detect spontaneous arrhythmias and nearly all AT1R mice studied (8 out of 9; old and young AT1R mice altogether) exhibited spontaneous cardiac arrhythmias during the telemetry monitoring. However, none of these mice died during the 24-hour recording period. Clearly, that recording time was sufficient to detect spontaneous arrhythmias, however, a much longer recording period would be necessary to obtain ECG evidence for spontaneous sudden death events.

Taken together the association of ventricular repolarization defects with the increased incidence of arrhythmias in AT1R mice is in support of a ventricular origin for the observed arrhythmias. However, we cannot exclude the possibility that conduction abnormalities could also contribute to some rhythm disturbances seen in these animals. Additional experimental studies are required to address this question.

In conclusion, data presented here reveal that overexpression of the human AT1R in the myocardium leads to an increased incidence of cardiac arrhythmia associated with delayed repolarization in mice. Importantly, these changes occurred before the development of cardiac remodeling and in absence of hypertension. These studies provide new insight into the role of chronic AT1R stimulation in the pathogenesis of cardiac arrhythmia and sudden death. These results could help to develop and understand therapeutic strategies preventing arrhythmic mortality associated with heart disease.

### **Funding**

This study was supported by an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research (CF). K. Rivard has a studentship award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). C. Fiset is a Research Scholar of the FRSQ.

### **Acknowledgements**

The authors are thankful to M.A. Lupien, M.A. Gillis and M. Laprise for skilled technical assistance and to Hao Wang for the measurements of the AT1R levels.

### **Conflict of interest**

All authors report no conflicts of interest.

## 2.2.6 References

1. Flesch M, Hoper A, Dell'Italia L, Evans K, Bond R, Peshock R *et al.* Activation and functional significance of the renin-angiotensin system in mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation* 2003;**108**:598-604.
2. Nakamura K, Fushimi K, Kouchi H, Mihara K, Miyazaki M, Ohe T *et al.* Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II. *Circulation* 1998;**98**:794-799.
3. Akar FG, Spragg DD, Tunin RS, Kass DA, Tomaselli GF. Mechanisms underlying conduction slowing and arrhythmogenesis in nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 2004;**95**:717-725.
4. Zhang C, Yasuno S, Kuwahara K, Zankov DP, Kobori A, Makiyama T *et al.* Blockade of angiotensin II type 1 receptor improves the arrhythmia morbidity in mice with left ventricular hypertrophy. *Circ J* 2006;**70**:335-341.
5. Rials SJ, Wu Y, Xu X, Filart RA, Marinchak RA, Kowey PR. Regression of left ventricular hypertrophy with captopril restores normal ventricular action potential duration, dispersion of refractoriness, and vulnerability to inducible ventricular fibrillation. *Circulation* 1997;**96**:1330-1336.
6. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000;**52**:415-472.
7. Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J *et al.* A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 1998;**93**:215-228.

8. Molkenstin JD. Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling. *Circ Res* 2000;**87**:731-738.
9. Wang Z, Kutschke W, Richardson KE, Karimi M, Hill JA. Electrical remodeling in pressure-overload cardiac hypertrophy: role of calcineurin. *Circulation* 2001;**104**:1657-1663.
10. Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis F, Thibault G, Nemer M. Overexpression of angiotensin II type 1 receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci* 2000;**97**:931-936.
11. Pitt B, Segal R, Martinez FA, Meurers G, Cowley AJ, Thomas I *et al.* Randomised trial of losartan versus captopril in patients over 65 with heart failure (Evaluation of Losartan in the Elderly Study, ELITE). *The Lancet* 1997;**349**:747-752.
12. Ricard P, Danilo P, Jr., Cohen IS, Burkhoff D, Rosen MR. A role for the renin-angiotensin system in the evolution of cardiac memory. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1999;**10**:545-551.
13. Domenighetti AA, Boixel C, Cefai D, Abriel H, Pedrazzini T. Chronic angiotensin II stimulation in the heart produces an acquired long QT syndrome associated with IK1 potassium current downregulation. *J Mol Cell Cardiol* 2007;**42**:63-70.
14. Mazzolai L, Nussberger J, Aubert JF, Brunner DB, Gabbiani G, Brunner HR *et al.* Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system. *Hypertension* 1998;**31**:1324-1330.
15. Xiao HD, Fuchs S, Campbell DJ, Lewis W, Dudley SC, Jr., Kasi VS *et al.* Mice with cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme (ACE) have atrial enlargement, cardiac arrhythmia, and sudden death. *Am J Pathol* 2004;**165**:1019-1032.

16. Zhai P, Yamamoto M, Galeotti J, Liu J, Masurekar M, Thaisz J *et al.* Cardiac-specific overexpression of AT1 receptor mutant lacking Galphaq/Galphai coupling causes hypertrophy and bradycardia in transgenic mice. *J Clin Invest* 2005;**115**:3045-3056.
17. Donoghue M, Wakimoto H, Maguire CT, Acton S, Hales P, Stagliano N *et al.* Heart block, ventricular tachycardia, and sudden death in ACE2 transgenic mice with downregulated connexins. *J Mol Cell Cardiol* 2003;**35**:1043-1053.
18. Trépanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res* 2001;**89**:437-444.
19. Brouillette J, Clark RB, Giles WR, Fiset C. Functional properties of K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Physiol* 2004;**559**:777-798.
20. Mitchell GF, Jeron A, Koren G. Measurement of heart rate and QT interval in the conscious mouse. *Am J Physiol* 1998;**274**:H747-H751.
21. Lizotte E, Tremblay A, Allen BG, Fiset C. Isolation and characterization of subcellular protein fractions from mouse heart. *Analytical Biochemistry* 2005;**345**:47-54.
22. Grandy SA, Trepanier-Boulay V, Fiset C. Postnatal Development has a Marked Effect on Ventricular Repolarization in Mice. *Am J Physiol* 2007:00521.
23. Aries A, Paradis P, Lefebvre C, Schwartz RJ, Nemer M. Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:6975-6980.
24. Wickenden AD, Lee P, Sah R, Huang Q, Fishman GI, Backx PH. Targeted expression of a dominant-negative Kv4.2 K<sup>+</sup> channel subunit in the mouse heart. *Circ Res* 1999;**85**:1067-1076.



25. Barry DM, Xu H, Schuessler RB, Nerbonne JM. Functional knockout of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac remodelling in mice expressing a dominant-negative Kv4  $\alpha$ -subunit. *Circ Res* 1998;**83**:560-567.
26. Xu H, Barry DM, Li H, Brunet S, Guo W, Nerbonne JM. Attenuation of the slow component of delayed rectification, action potential prolongation, and triggered activity in mice expressing a dominant-negative Kv2  $\alpha$ -subunit. *Circ Res* 1999;**85**:623-633.
27. Zaritsky JJ, Redell JB, Tempel BL, Schwarz TL. The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K<sup>+</sup> current (I<sub>K1</sub>) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *J Physiol* 2001;**533**:697-710.
28. Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. Alterations of K<sup>+</sup> currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993;**73**:379-385.
29. Kaab S, Nuss HB, Chiamvimonvat N, O'Rourke B, Pak PH, Kass DA *et al.* Ionic mechanisms of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res* 1996;**78**:262-273.
30. Priebe L, Beuckelmann DJ. Simulation study of cellular electric properties in heart failure. *Circ Res* 1998;**82**:1206-1223.
31. London B, Guo W, Pan X, Lee JS, Shusterman V, Rocco CJ *et al.* Targeted replacement of KV1.5 in the mouse leads to loss of the 4-aminopyridine-sensitive component of I(K,slow) and resistance to drug-induced qt prolongation. *Circ Res* 2001;**88**:940-946.
32. Zhou J, Kodirov S, Murata M, Buckett PD, Nerbonne JM, Koren G. Regional upregulation of Kv2.1-encoded current, I<sub>K,slow2</sub>, in Kv1DN mice is abolished by

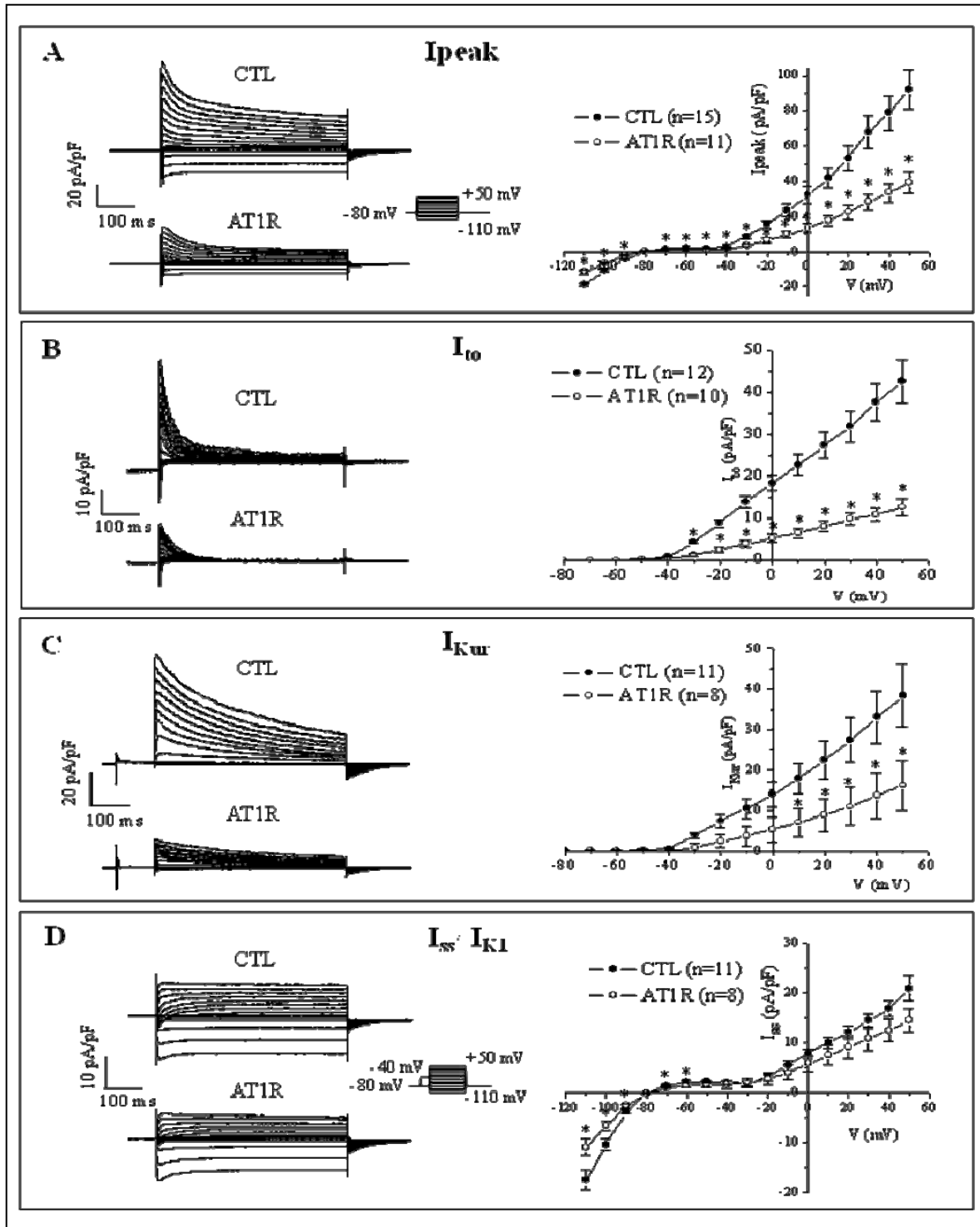
- crossbreeding with Kv2DN mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;**284**:H491-H500.
33. Fischer R, Dechend R, Gapelyuk A, Shagdarsuren E, Gruner K, Gruner A *et al*. Angiotensin II-induced sudden arrhythmic death and electrical remodeling. *Am J Physiol* 2007:01400.
  34. Hayabuchi Y, Davies NW, Standen NB. Angiotensin II inhibits rat arterial KATP channels by inhibiting steady-state protein kinase A activity and activating protein kinase C $\epsilon$ . *J Physiol* 2001;**530**:193-205.
  35. Toro L, Amador M, Stefani E. ANG II inhibits calcium-activated potassium channels from coronary smooth muscle in lipid bilayers. *Am J Physiol* 1990;**258**:H912-H915.
  36. Clement-Chomienne O, Walsh MP, Cole WC. Angiotensin II activation of protein kinase C decreases delayed rectifier K<sup>+</sup> current in rabbit vascular myocytes. *J Physiol* 1996;**495** ( Pt 3):689-700.
  37. Zhang TT, Takimoto K, Stewart AFR, Zhu C, Levitan ES. Independent Regulation of Cardiac Kv4.3 Potassium Channel Expression by Angiotensin II and Phenylephrine. *Circ Res* 2001;**88**:476-482.
  38. Yu H, Gao J, Wang H, Wymore R, Steinberg S, McKinnon D *et al*. Effects of the renin-angiotensin system on the current I<sub>to</sub> in epicardial and endocardial ventricular myocytes from the canine heart. *Circ Res* 2000;**86**:1062-1068.
  39. Shimoni Y. Inhibition of the formation or action of angiotensin II reverses attenuated K<sup>+</sup> currents in type 1 and type 2 diabetes. *J Physiol* 2001;**537**:83-92.

### 2.2.7 Figures / Figures Legend

#### Figure 1. $K^+$ currents in 6-8 mo AT1R ventricular mouse myocytes.

A. The total  $K^+$  current ( $I_{peak}$ ). *Left* - Representative family of  $I_{peak}$  recorded from CTL and AT1R ventricular myocytes using the protocol shown in inset. *Right* - Comparison of mean I-V curves for  $I_{peak}$  (\*p<0.05). B.  $I_{to}$  - *Left*. Superimposed current records corresponding to  $I_{to}$  calculated by subtraction of current traces recorded with and without an inactivating prepulse (100ms, -40mV) applied before the main activation steps (protocol shown in inset, Panel D).<sup>19</sup> *Right*. Mean I-V curves for  $I_{to}$  (\*p<0.05). C.  $I_{Kur}$  - *Left*. After inactivation of  $I_{to}$  the remaining outward current (recorded with the protocol shown in inset, panel D) is composed of  $I_{Kur}$  and  $I_{ss}$  and can be separated with 100  $\mu$ M of 4-aminopyridine (4-AP). Family of membrane currents presented in the left panel represents  $I_{Kur}$  (the 4-AP-sensitive component) in CTL and AT1R cells. *Right*. Corresponding mean I-V curves for  $I_{Kur}$  (\*p<0.05). D.  $I_{ss}$  and  $I_{K1}$  - *Left*. Typical examples of  $I_{K1}$  and the 4-AP resistant component of the outward current,  $I_{ss}$ , recorded in CTL and AT1R myocytes. *Right*. Corresponding I-V curves for  $I_{K1}$  and  $I_{ss}$  showing that  $I_{K1}$  was significantly reduced in AT1R mice (\*p<0.05) whereas  $I_{ss}$  was similar in CTL and AT1R myocytes. Electrophysiological protocols used to record the different  $K^+$  currents are described in the data supplement.

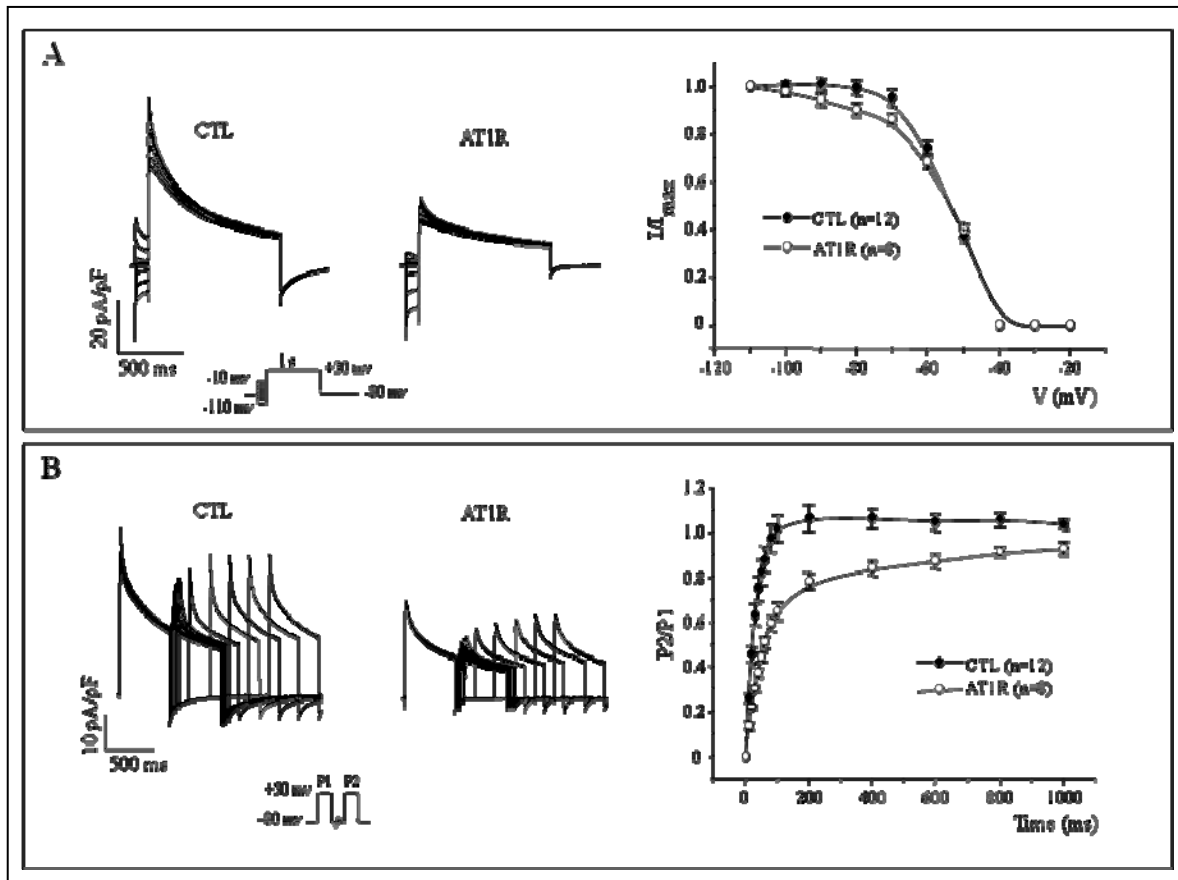
Figure 1.  $K^+$  currents in 6-8 mo AT1R ventricular mouse myocytes.



**Figure 2. Steady-state inactivation and reactivation of  $I_{to}$  in 6-8 mo AT1R ventricular mouse myocytes**

A. Voltage dependence of steady-state inactivation of  $I_{to}$ . *Left* - Typical examples of family of currents. *Right* - Plot of voltage dependence of the steady-state inactivation of  $I_{to}$ . The amplitude of  $I_{to}$  for each prepulse membrane potential was determined by subtracting each test pulse current with that obtained with the -40 mV prepulse. The  $I_{to}$  test pulse amplitude was normalized to the amplitude at the most negative prepulse potential ( $I/I_{max}$ ). B. Reactivation of  $I_{to}$ . *Left* - Example of family of membrane currents showing the time-course of recovery of  $I_{to}$  from inactivation. A 500-ms inactivating pulse (+50 mV) was followed at intervals of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 200, 400, and 600 ms by an identical test pulse. *Right* - Membrane potential dependence of recovery from inactivation of  $I_{to}$ .  $P_2/P_1$  is the ratio of test pulse current/prepulse current amplitudes.  $I_{to}$  amplitude was measured as the difference between peak outward current and the current 150 ms after the peak. The smooth lines are best-fit single exponential functions.

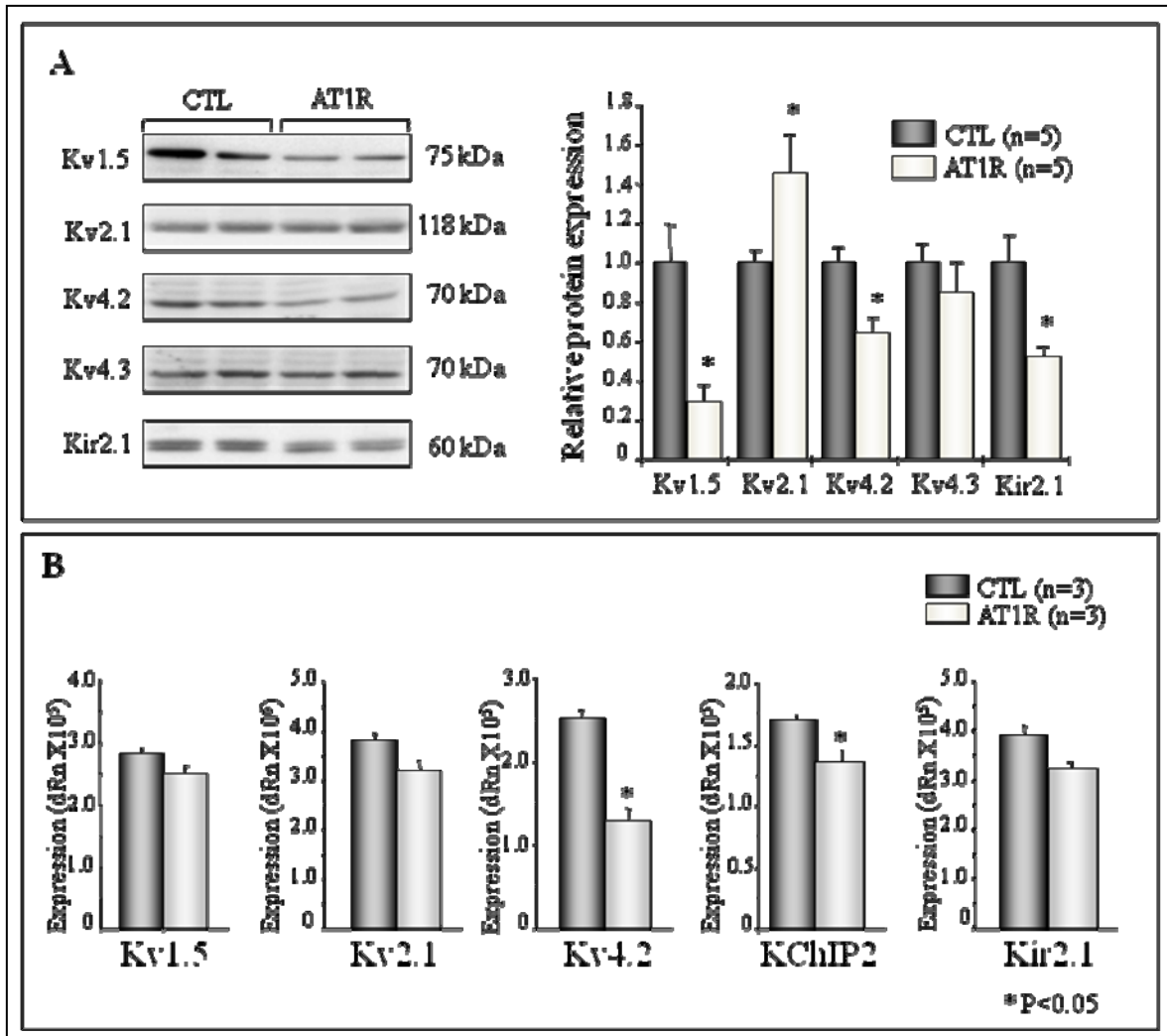
Figure 2. Steady-state inactivation and reactivation of  $I_{to}$  in 6-8 mo AT1R ventricular mouse myocytes



**Figure 3. K<sup>+</sup> channel expression in 6-8 mo AT1R mouse ventricles**

A. Protein expression of K<sup>+</sup> channels. Western blot analysis of Kv1.5 (1:500), Kv2.1 (1:500), Kv4.2 (1:1000), Kv4.3 (1:5000) and Kir2.1 (1:500) on sarcolemmal-enriched fraction (100 µg/lane, 1 ventricle/sample) isolated from CTL and AT1R ventricle. Equal protein loading was confirmed by ponceau-S stained membranes. Bar graph (right) represents relative protein expression of the K<sup>+</sup> channels determined by densitometry. Relative abundance was calculated with the value of CTL as a reference of 100% (\*P<0.05). B. mRNA expression of K<sup>+</sup> channels. Bar graph comparing the abundance of Kv1.5, Kv2.1, Kv4.2, KChIP2 and Kir2.1 mRNA transcripts in CTL and AT1R mice determined by real-time PCR. Each sample was analyzed in triplicate (\*P<0.05).

Figure 3.  $K^+$  channel expression in 6-8 mo AT1R mouse ventricles

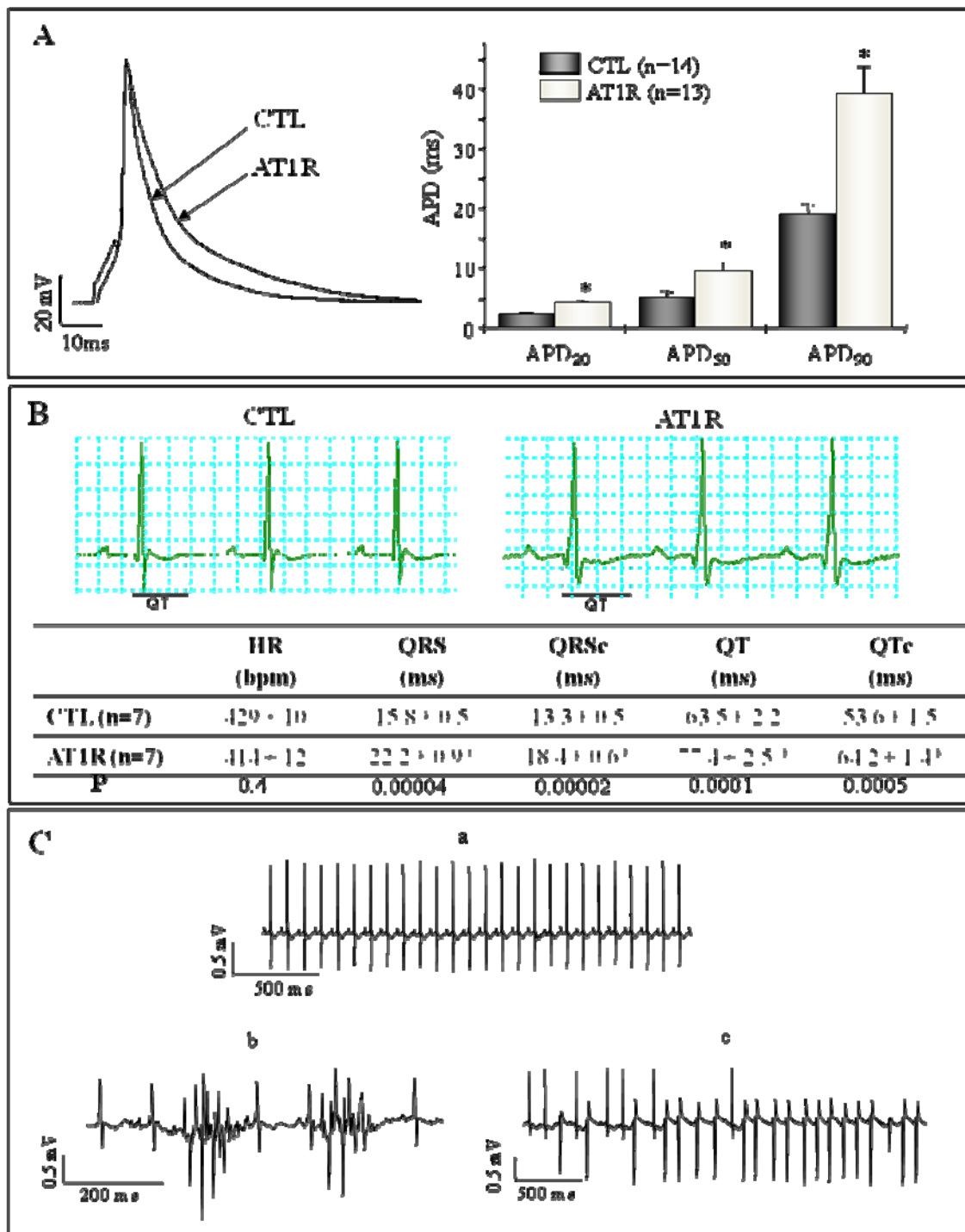




**Figure 4. Ventricular repolarization and cardiac rhythm in 6-8 mo AT1R mice**

A. Comparison of APDs between CTL and AT1R mice. *Left* - Typical examples of AP recorded at 4 Hz. Bar graph (right) shows mean APD<sub>20</sub>, APD<sub>50</sub> and APD<sub>90</sub> ( $\pm$ SEM) (\* $p < 0.01$ ). B. Table comparing mean values for ECG parameters between CTL and AT1R mice obtained with surface ECG recordings. C. Representative ECG recordings obtained with telemetry monitoring in CTL and AT1R mice. These examples illustrate polymorphic (b) and monomorphic (c) irregular rhythms observed in 2 AT1R mice, whereas no rhythm abnormalities were recorded in CTL (a).

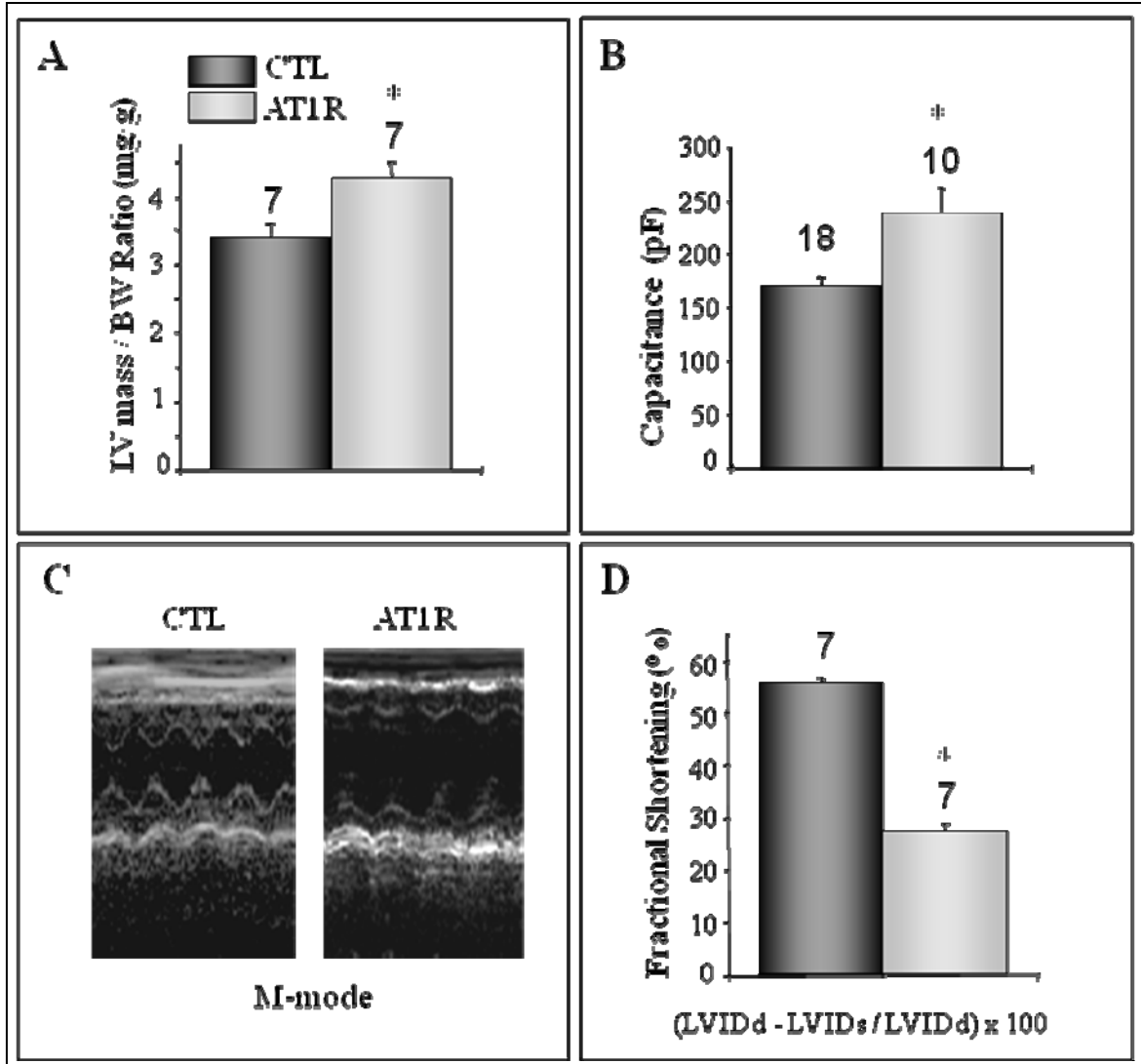
Figure 4. Ventricular repolarization and cardiac rhythm in 6-8 mo AT1R mice



**Figure 5. Cardiac function in 6-8 mo AT1R mice**

**A.** Bar graph compares the left ventricular mass (LV mass) corrected for body weight (BW) between CTL and AT1R ( $p=0.01$ ). **B.** Comparison of the cell capacitance measured in CTL and AT1R ventricular myocytes ( $p=0.01$ ). **C.** Typical example of an M-mode echocardiography used to calculate the FS. **D.** Left ventricular FS =  $(\text{LVIDd} - \text{LVIDs} / \text{LVIDd}) \times 100$  ( $p<0.00001$ ).

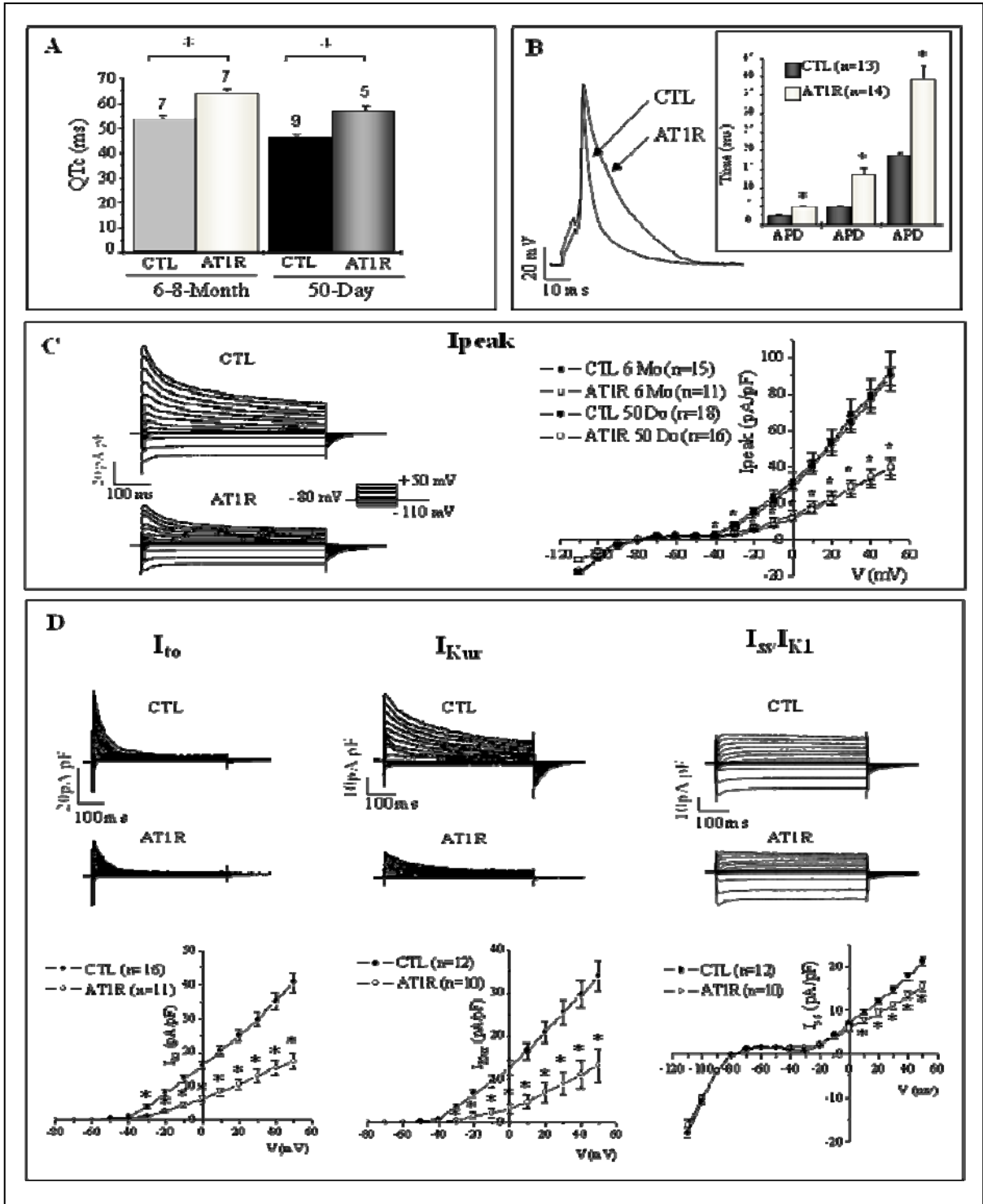
Figure 5. Cardiac function in 6-8 mo AT1R mice



**Figure 6. Comparison of the ventricular repolarization phenotype between 6-8 mo and 50 days AT1R male mice**

**A.** Comparison of the QTc interval between the CTL and AT1R mice at 50 days and 6-8 mo (\*  $P < 0.05$ ). **B.** Comparison of APD between 50 days CTL and AT1R mice. Typical examples of AP recorded at 4 Hz are presented. Bar graph presents mean APD ( $\pm$ SEM) (\* $p < 0.05$ ). **C.** Comparison of  $I_{peak}$  in CTL and AT1R at 6-8 mo and 50 days mice. *Left* - Typical examples of  $I_{peak}$  recorded in CTL and AT1R myocytes at 50 days. *Right* - Mean I-V curves obtained in CTL and AT1R mice in the 2 age groups. (Symbols, square: 6-8 mo mice, circle: 50 days mice) (\* $p < 0.05$  for young AT1R group). **D.** Comparison of individual  $K^+$  currents in 50 days CTL and AT1R mice. Representative family of currents (Top) and comparison of mean I/V curve between CTL and AT1R myocytes (Bottom) for  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$  and  $I_{ss}/I_{Kl}$  are presented (\*  $p < 0.05$ ).

Figure 6. Comparison of the ventricular repolarization phenotype between 6-8 mo and 50 days AT1R male mice



## 2.2.8 Online data supplement

### Ventricular myocytes isolation

CTL and AT1R mice were heparinized (1 U/kg; IP) 20 min prior to sacrifice, anaesthetized by inhalation with isoflurane and then killed by cervical dislocation. The hearts were rapidly removed, and retrogradely perfused (2 ml/min) through the aorta on a modified Langendorff apparatus with the following solutions: (i) 5 minutes with HEPES-buffered Tyrode solution containing (in mM): 130 NaCl; 5.4 KCl; 1 CaCl<sub>2</sub>; 1 MgCl<sub>2</sub>; 0.3 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10 HEPES; 5.5 glucose (pH adjusted to 7.4 with NaOH), (ii) 10 min with Tyrode solution without Ca<sup>2+</sup> (“Ca<sup>2+</sup>-free”), (iii) 20 min with Ca<sup>2+</sup>-free Tyrode solution containing 73.7 U ml<sup>-1</sup> collagenase type 2 (Worthington Co. Ltd, Freehold, NJ, USA); 0.1% bovine serum albumin (BSA; Fraction V, Sigma Chemicals Co., St. Louis, Mo, USA); 20 mM taurine and 30 μM CaCl<sub>2</sub>, and (iv) 5 min 30 sec with a “KB” solution<sup>1</sup> containing (in mM): 100 K<sup>+</sup>-glutamate; 10 K<sup>+</sup>-aspartate; 25 KCl; 10 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2 MgSO<sub>4</sub>; 20 taurine; 5 creatine base; 0.5 EGTA; 5 HEPES; 0.1% BSA; 20 glucose (pH adjusted to 7.2 with KOH). The temperature of the perfusion was maintained at 37±1 °C. At the end of the perfusion, the right ventricular free wall was dissected from the heart and placed in KB solution. The tissue was then minced and triturated for 10 min to free individual ventricular myocytes. Myocytes were stored in KB solution at 4 °C until needed.

### Electrophysiology

*Cellular electrophysiology.* Whole-cell voltage and current-clamp recordings were performed on the myocytes using ruptured patch technique with a patch-clamp amplifier, Axopatch 200 B (Axon Instruments, Foster City, USA) and data were recorded and analyzed with pClamp 8.0 software (Axon Instruments, Foster City, USA). Cells were continuously perfused with oxygenated Tyrode solution containing (in mM): 130 NaCl; 5.4 KCl; 1 CaCl<sub>2</sub>; 1 MgCl<sub>2</sub>; 0.3 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10 HEPES; 5.5 glucose (pH adjusted to 7.4 with

NaOH). Pipettes had resistances between 1.5-3.5 M $\Omega$  when filled with the following solution (mM): 110 K<sup>+</sup>-aspartate, 20 KCl, 8 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 BAPTA, 4 K<sub>2</sub>ATP and 10 HEPES (pH 7.2 with KOH). Series resistance (Rs) was between 4-8 M $\Omega$ ; and compensation was applied to reduce Rs by 80-90%. Voltage-clamp currents were low-pass filtered at 1 kHz with a 4-pole Bessel analog filter, digitized at 4-10 kHz. To account for differences in cell size, current amplitudes were normalized to the cell capacitance, and expressed as densities (pA/pF). Capacitive transients elicited by a 10 mV depolarizing step from a holding potential of -80 mV were recorded at 25 kHz (filtered at 10 kHz). Cell capacitance was measured by integrating the surface area of these capacitive transient. To compensate for the patch pipette-bath liquid junction potential (K<sup>+</sup>-Aspartate) recorded membrane potentials were corrected by -10 mV. All experiments were carried out at room temperature (20-22°C).

***K<sup>+</sup> currents recordings.*** Current-voltage relationship for the total K<sup>+</sup> current ( $I_{\text{peak}}$ ) was constructed from the current elicited by a series of 500 ms test potentials varying from -110 mV to +50 mV in 10 mV increments from a holding potential of -80 mV at a frequency rate of 0.1 Hz. We then examined the contribution of individual outward K<sup>+</sup> currents:  $I_{\text{to}}$ ,  $I_{\text{Kur}}$  and  $I_{\text{ss}}$ . First, we eliminated the transient portion (or  $I_{\text{to}}$ ) by applying an inactivating prepulse (100 ms, -40 mV) preceding the main activation steps. We then compared the density of  $I_{\text{to}}$  obtained by subtracting the current traces measured with and without the inactivating prepulse. The current remaining after inactivation of  $I_{\text{to}}$  is denoted  $I_{\text{Kslow}}$  and is composed of  $I_{\text{Kur}}$  (or the 4-aminopyridine (4-AP)-sensitive component) and  $I_{\text{ss}}$  (or the 4-AP-resistant component). To measure  $I_{\text{ss}}$ , we applied 100  $\mu$ M 4-AP (which blocks  $I_{\text{Kur}}$ ) in combination with an inactivating prepulse (which blocks  $I_{\text{to}}$ ) and then recorded  $I_{\text{ss}}$ . We measured  $I_{\text{Kur}}$  by subtracting currents recorded in absence or presence of 4-AP ( $I_{\text{Kslow}} - I_{\text{ss}}$ ). The description and validation of these pharmacological and biophysical methods has been recently published<sup>2</sup>.



$K^+$  currents were recorded in absence of sodium or L-type  $Ca^{2+}$  currents blockers to allow recordings of  $K^+$  currents and action potentials from the same myocyte. Under our recording conditions (room temperature, presence of BAPTA in the intracellular solution),  $I_{Ca}$  are small. Also, the intrinsic very fast activation and inactivation of  $I_{Na}$  prevent interference of this current with  $K^+$  currents ( $I_{Na}$  activates and inactivates before  $K^+$  currents fully activate).

***Steady-state inactivation.*** The voltage-dependence of steady-state inactivation for  $I_{to}$  and  $I_{Kur}$  were measured using two-step voltage-clamp protocol. The first step is an inactivating pulse to selected potential (from -110 to -10 mV) maintained for a period of 1 s or 5 s, for  $I_{to}$  and  $I_{Kur}$ , respectively. This inactivating pulse is followed by a second voltage step to +30 mV during 1 s ( $I_{to}$ ) or 5 s ( $I_{Kur}$ ) (See figure inset for voltage protocols). For the  $I_{Kur}$  recording, a pulse at -40 mV for 100 ms had been added between the inactivating and test pulse to inactivate  $I_{to}$ . Both  $I_{to}$  and  $I_{Kur}$  currents amplitude at each pulse potential were normalized to the maximum amplitude of each family of current ( $I/I_{max}$ ) and plotted as a function of the inactivating pre-pulse potential. Data were fit to a Boltzmann equation :  $I/I_{max} = 1 / [1 + \exp((V_m - V_{1/2})/S_{1/2})]$ , where  $V_{1/2}$  represents the membrane potential ( $V_m$ ) at which 50% of the channels are inactivated and  $S_{1/2}$ , is the mid-point slope factor (mV).

***Recovery from inactivation.*** To measure the time dependence for reactivation of  $I_{to}$  and  $I_{Kur}$ , an inactivating pulse (at +30 mV, maintain for 500 ms and 1.5 s period for  $I_{to}$  and  $I_{Kur}$  respectively) was followed at variable time intervals by a test pulse (at +30 mV for 500 ms for both types of current) (Protocols are shown in figure inset). The interpulse period varied between 10 and 600 ms for  $I_{to}$  recording and between 50 ms and 3 s for  $I_{Kur}$ . Specifically to  $I_{Kur}$ , both inactivating and test pulse were preceded by a pulse of 100 ms at -40 mV to inactivate  $I_{to}$ .  $I_{Kur}$  amplitude was measured by subtraction amplitude of outward current at the peak and 500 ms after the peak. For both families of current, the holding and interpulse potentials were -80 mV. Analysis of the recovery from inactivation was made using P2/P1

ratio plotted as a function of interpulse time and time constant was calculated (ms). P2 represents current amplitude of the test pulse and P1 corresponds to the inactivating pulse.

**Action potential recordings.** Action potentials were recorded at frequency rates of 1 to 4 Hz with the whole-cell current-clamp protocol by injection of brief (1-3 ms) stimulus currents (0.4-0.7 nA). The action potential durations of control and AT1R mouse ventricular myocytes were measured at 20, 50 and 90% of repolarization.

**Surface electrocardiogram (ECG).** Mice were anaesthetized with isoflurane. Mouse body temperature was maintained at 37°C using a heating pad. Platine electrodes were placed subcutaneous and surface ECG was acquired in lead I configuration. Acquisition was performed using the Biopac System MP100 at a rate of 2 kHz. The signal was amplified, filtered at 100 Hz (low-pass) and 60 KHz (notch filter). Data were analyzed using ECG auto 1.5.<sup>3</sup> The QT intervals and other ECG parameters were measured by two blinded observers from signal averaged ECG recordings.

**Telemetry recording.** Data was acquired with an implantable OpenHeart® radiofrequency transmitter, (Data Sciences International, Arden Hills, MN). Individual transmitters were implanted into a right lateral abdominal subcutaneous pouch of CTL and AT1R mice (6-8 months, n=6 per group; 50 days, n=4 CTL and 3 AT1R). ECG lead placement represented the lead II configuration. All mice were allowed to recover for 1 week after surgery. ECG were continuously recorded for a period of 24 hours and saved onto disk for later analysis. Recordings were analyzed with ECG Auto (version 1.5, EMKA technologies, Paris, France).<sup>4</sup>

### **Western blots analysis**

Proteins were prepared from ventricles of CTL and AT1R mice (1 heart/sample). Protein (100 µg/lane) were separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred on PVDF membranes and assayed for K<sup>+</sup> channels expression by Western blot. Rabbit

polyclonal primary antibodies directed against Kv1.5 (1:500), Kv2.1 (1:500), Kv4.2 (1:1000), Kv4.3 (1:1000) and Kir2.1 (1:500) were used. All antibodies were purchased from Alomone Labs (Jerusalem, Israel), with the exception of Kv1.5, which was obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA). Bands were quantified by densitometry using Multi-Analyst program (Bio-Rad, Ca, USA).

### **Real time PCR**

Total RNA was isolated from CTL and AT1R ventricles using RNeasy Fibrous Tissue kit (Qiagen) and treated with DNase I. cDNA fragments were synthesized by RT using the cloned AMV reverse transcriptase (InVitrogen). Primers specific to each K<sup>+</sup> channel studied (Kv1.5, Kv2.1, Kv4.2, Kir2.1 and KChIP2) were designed, tested by real-time PCR and a melting curve was performed to assure an amplification of a unique cDNA product. Sequence analysis was performed on all PCR-generated cDNA fragments to ascertain the specificity of the products. The real-time PCR reaction was carried out with Platinum SYBR Green qPCR Supermix (InVitrogen) using a real-time PCR system (MX3005P QPCR system, Stratagene). The PCR reactions were cycled 40 times using a 3-step cycle procedure (denaturation at 95°C for 30s, annealing at 50°C for 45s, elongation at 72°C for 45s) after an initial stage at 95°C for 10 min to activate the Taq polymerase. mRNA expression was quantified relative to the murine cyclophylin. mRNA expression was quantified by measuring fluorescence intensities at the beginning of the linear region of the fluorescence versus cycle number curves (amplification curves).

### **Echocardiography**

Two-dimensional guided M-mode echocardiography was performed under conscious sedation with 10 µL/g i.p. of 1:1 mixture of Fentanyl (5 µg /ml) and Droperidol (250 µg/ml) using a Philips Sonos 5500 and a 15-MHz linear-array transducer. The mice were

lightly secured in the left lateral decubitus position on a warming pad to maintain normothermia. To improve the nearfield image for visualization of the interventricular septum, a standorff constituted of a 3 to 5 mm thick 1% agarose pad, was inserted between the chest of the mice and the transducer. The montage was acoustically sealed with prewarm acoustic coupling gel. Fractional shortening (FS) and left ventricular mass (LV mass) were determined.

#### REFERENCES

1. Isenberg G, Klockner U. Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". *Pflug Arch* 1982;**395**:6-18.
2. Brouillette J, Clark RB, Giles WR, Fiset C. Functional properties of K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Physiol* 2004;**559**:777-798.
3. Brouillette J, Trepanier-Boulay V, Fiset C. Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *J Physiol* 2003;**546**:403-413.
4. Brouillette J, Grandy SA, Jolicoeur P, Fiset C. Cardiac repolarization is prolonged in CD4C/HIV transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 2007;**43**:159-167.

## **Chapitre 3**

### **Caractérisation de la repolarisation ventriculaire chez les souris surexprimant le récepteur $\alpha_{1B}$ -adrénergique au niveau cardiaque**

## 3.1 Avant-Propos

### 3.1.1 Introduction

Le système nerveux sympathique joue un rôle crucial sur la régulation de la fonction cardiaque. La norépinéphrine, un des principaux régulateurs physiologiques du système sympathique, peut agir directement au niveau cardiaque en liant les récepteurs adrénergiques. Au niveau cardiaque, on retrouve principalement les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et  $\alpha_1$ -adrénergiques. Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques sont les principaux régulateurs de la fonction cardiaque. Toutefois, en conditions pathologiques telle que lors du remodelage cardiaque, l'activité des récepteurs  $\alpha_1$  est augmentée pour compenser la diminution de la réponse des récepteurs  $\beta$ . L'activation excessive des récepteurs  $\alpha_1$  est associée à plusieurs troubles cardiaques tels que l'hypertrophie, le remodelage, l'insuffisance cardiaque et la survenue d'arythmies.

Il existe trois types de récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques, soient  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  et  $\alpha_{1D}$ . Seulement  $\alpha_{1A}$  et  $\alpha_{1B}$  sont fonctionnels au niveau cardiaque et il semble que le récepteur  $\alpha_{1B}$  joue un rôle important dans la réponse du système adrénergique en conditions physiologiques et pathologiques. Afin d'étudier les effets spécifiques de l'activation de chacun des sous-types de récepteurs *in vivo*, des modèles de souris transgéniques ont été créés. L'un de ces modèles est la souris  $\alpha_{1B}$ -AR, qui surexprime spécifiquement au niveau cardiaque le récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénergique natif. Les souris  $\alpha_{1B}$ -AR développent un phénotype pathologique correspondant à une cardiomyopathie dilatée, sans phase hypertrophique, qui diminue la fonction cardiaque et évolue en insuffisance cardiaque et à la mort prématurée de ces souris. De plus, les souris  $\alpha_{1B}$ -AR ont une incidence accrue d'arythmies cardiaques. Ainsi, puisque (1) l'activité des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques est augmentée lors du remodelage cardiaque, (2) que le remodelage est associé avec une prolongation de la repolarisation (facteur de risque au développement d'arythmies) et (3) que les souris  $\alpha_{1B}$ -

AR ont des arythmies, nous avons caractérisé la repolarisation ventriculaire des souris  $\alpha_{1B}$ -AR afin de déterminer si l'activation accrue des récepteurs  $\alpha_{1B}$ -adrénergiques pouvait directement affecter la repolarisation et rendre ces souris susceptibles d'avoir des arythmies sévères.

Pour atteindre cet objectif, (1) nous avons utilisé des techniques de patch-clamp pour mesurer les courants  $K^+$  et la durée des potentiels d'action, (2) nous avons enregistré des ECG pour mesurer l'intervalle QTc et évaluer l'incidence d'arythmies et (3) nous avons utilisé la biologie moléculaire (Western Blot et PCR en temps réel) pour mesurer l'expression des canaux  $K^+$ . Comme pour le projet sur les souris AT1R, nous avons utilisé les souris mâles  $\alpha_{1B}$ -AR et contrôles de deux groupes d'âge correspondant à la phase précédant le remodelage (2-3 mois) et au stade avancé de la pathologie (9-12 mois).

### 3.1.2 Contribution des auteurs

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| <b>Katy Rivard:</b>                | Stratégie expérimentale, expériences, analyse, rédaction.                 |
| <b>Véronique Trépanier-Boulay:</b> | Expériences et analyse (cinétiques)                                       |
| <b>Hansjorg Rindt:</b>             | Collaborateur, fourni la souris $\alpha_{1B}$ -AR, conseils et discussion |
| <b>Céline Fiset:</b>               | Conceptualisation du projet, supervision, rédaction finale                |

### 3.2 Article

*American Journal of physiology (Heart Circ Physiol)* **296(3)** (2009) H704-18

#### **Electrical Remodeling in a Transgenic Mouse Model of $\alpha_{1B}$ -Adrenergic Receptor Overexpression**

Katy Rivard, MSc,<sup>1,2</sup> Véronique Trépanier-Boulay, MSc,<sup>1,2</sup> Hansjorg Rindt, PhD,<sup>1,3</sup>  
and Céline Fiset, PhD<sup>1,2†</sup>

<sup>1</sup> Research Center, Montreal Heart Institute

5000 Bélanger, Montréal, Québec, Canada, H1T 1C8

<sup>2</sup> Faculty of Pharmacy, Université de Montréal

Montréal, Québec, Canada

<sup>3</sup> Present Address: University of Missouri-Columbia, Dept. of Veterinary Pathology, 404  
Christopher S. Bond, Life Sciences Centre, 1201 Rollins Street,  
Columbia, MO, 65211 USA.

Running title: Repolarization delay in mutant  $\alpha_{1B}$ -AR mice



### 3.2.1 Résumé / Abstract

#### 3.2.1.1 Résumé

La surexpression au niveau cardiaque des récepteurs  $\alpha_{1B}$ -adrenergiques de type chez la souris ( $\alpha_{1B}$ -AR) prédispose à la cardiomyopathie dilatée et à la mort subite. Bien que la stimulation  $\alpha$ -adrenergique semble contribuer au développement d'arythmies lors de l'insuffisance cardiaque, les conséquences de la stimulation chronique de l'activation  $\alpha_1$ -adrenergique n'ont pas été clairement définies. Ainsi, nous avons caractérisé la repolarisation ventriculaire et vérifié l'incidence d'arythmies chez les souris  $\alpha_{1B}$ -AR insuffisante cardiaque (9-12 mois) et les souris plus jeunes (2-3 mois) qui n'ont pas de signe d'insuffisance. Comparés aux souris contrôles, l'intervalle QTc était 34% plus long et le potentiel d'action était significativement prolongé chez les  $\alpha_{1B}$ -AR de 9-12 mois. Ces changements étaient associés avec une diminution de la densité des courants  $K^+$  sortant  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$  and  $I_{ss}$  (à +30 mV, réduction de 68%, 64% et 41%, respectivement) et de l'expression des canaux  $K^+$  correspondants. Les enregistrements d'ECG ont révélé que les souris  $\alpha_{1B}$ -AR plus âgées avaient des arythmies ventriculaires spontanées. Le retard de repolarisation observé pourrait ainsi contribuer à ces troubles du rythme et semble être causé par l'activité  $\alpha_{1B}$ -AR chronique. Les données recueillies chez les souris  $\alpha_{1B}$ -AR de 2-3 mois montrent que le remodelage électrique est aussi présent chez les transgéniques plus jeunes. Toutefois, il semble que ces changements soient moins prononcés que chez les souris plus âgées. Ces résultats suggèrent qu'il y a deux phases de remodelage, une causée par l'activité  $\alpha_{1B}$ -adrenergique chronique et une seconde causée par l'insuffisance cardiaque. L'ensemble de ces résultats fournit des évidences claires sur le rôle pathologique de l'activité  $\alpha_{1B}$ -AR chronique sur le développement des troubles de repolarisation et l'incidence d'arythmies.

Mots clés : Récepteurs  $\alpha_{1B}$ -adrenergique, repolarisation, ventricule de souris, arythmies, courants  $K^+$ .

### 3.2.1.2 Abstract

Cardiac-specific overexpression of wild-type  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptors ( $\alpha_{1B}$ -AR) in mice predisposes to dilated cardiomyopathy and sudden death. Although  $\alpha$ -adrenergic stimulation is thought to contribute to induction of arrhythmias in heart failure, the electrophysiological consequences of chronic  $\alpha_1$ -adrenergic activation have not been clearly defined. Thus, we characterized ventricular repolarization and monitored incidence of spontaneous arrhythmias in end-stage heart failure  $\alpha_{1B}$ -AR mice (9-12 months) and younger  $\alpha_{1B}$ -AR mice (2-3 months) that do not present signs of heart failure. Compared to aged matched controls, the QTc interval was 34% longer in the 9-12 months  $\alpha_{1B}$ -AR mice and the action potential durations were also significantly prolonged in these mice. These changes were associated with a decrease in the density of the outward  $K^+$  currents  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$  and  $I_{ss}$  (at +30 mV, reduction of 68%, 64% and 41%, respectively) and underlying  $K^+$  channel expression. ECG recordings revealed that older  $\alpha_{1B}$ -AR mice exhibited spontaneous ventricular arrhythmias. The alterations in repolarization can contribute to these rhythm abnormalities and are likely caused by chronic  $\alpha_{1B}$ -AR activity. Additional data obtained in 2-3 months  $\alpha_{1B}$ -AR mice clearly showed that electrical remodeling was already observed in younger transgenic animals. However, it appeared to be slightly less pronounced than in older mice. These results suggest that there are two waves of remodeling, one due to chronic  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor activity and a second due to heart failure. Taken together, these data provide strong evidence for a pathological role of chronic  $\alpha_{1B}$ -AR activity in the development of repolarization defects and ventricular arrhythmias.

**Key Words:**  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor, repolarization, mouse ventricle, arrhythmias,  $K^+$  currents.

### 3.2.2 Introduction

The sympathetic nervous system plays a crucial role in the regulation of cardiac function. Evidence suggests the involvement of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors in different types of cardiac dysfunctions. For instance, enhanced  $\alpha_1$ -adrenergic receptor activity has been shown to be involved in cardiac ischemia, ischemic preconditioning, cardiac hypertrophy, heart failure and arrhythmias (13; 39; 45). Several subtypes of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors coexist in the heart ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  and  $\alpha_{1D}$ ) (13; 38). Pharmacological studies as well as transgenic animal models have been used to identify important physiological and pathological roles of  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtypes in the heart. Based on these studies, the  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor appears to be the major subtype of cardiac  $\alpha_1$ -adrenoceptors under both physiological and pathological conditions (1; 8; 13; 17; 28; 48). Consistent with an important role in cardiac pathology, Lemire *et al.* showed that cardiac-specific overexpression of  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptors in transgenic mice leads to heart failure and that these mice develop a slowly progressing cardiac chamber dilation followed by premature death with clinical signs of heart failure at around 9 to 12 months of age. This phenotype mimics that of idiopathic dilated cardiomyopathy in humans, including differential regulation of hypertrophy/heart failure genes, functional downregulation of the  $\beta$ -adrenergic receptor signalling cascade, progressive loss of left ventricular function and increased prevalence of arrhythmias (28). It is well recognized that elevated levels of norepinephrine and increased  $\alpha_1$ -adrenergic receptor stimulation are implicated in the pathogenesis of heart failure. Increased  $\alpha_1$ -adrenergic receptor stimulation is also thought to contribute to the higher prevalence of arrhythmias (39). One of the consistent feature of heart disease, in both human and experimental model systems, is prolongation of action potential duration (APD), which increases the propensity to develop cardiac arrhythmias (4; 24; 46). Thus, it is possible that increased  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation would lead to delayed repolarization which could increase electrical instability and contribute to arrhythmias in heart failure patients.

A number of studies have shown that acute stimulation with  $\alpha_1$ -agonists can result in a decreased density of several  $K^+$  currents and APD prolongation (2; 12; 13; 15; 19; 20; 33; 36; 36; 52) and  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation can contribute to arrhythmias in heart failure. However, the electrophysiological consequences of chronic  $\alpha_1$ -adrenergic activity specifically in cardiomyocytes have not been defined. Accordingly, in the present study, we examined the influence of chronic  $\alpha_{1B}$ -adrenergic stimulation on ventricular repolarization and on the incidence of spontaneous arrhythmias using a transgenic mouse overexpressing the wild-type  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor ( $\alpha_{1B}$ -AR mice) specifically in cardiomyocytes. The cardiac phenotype of this transgenic mouse model has been described in detail elsewhere (17; 28). Results presented here demonstrate that chronic activity of  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptors results in profound alteration in ventricular repolarization which could contribute to the development of cardiac arrhythmias and sudden cardiac death.

### **3.2.3 Materials and methods**

#### **3.2.3.1 Animals**

The generation of the mouse line with transgenic overexpression of the wild-type form of  $\alpha_{1B}$ -AR has been described previously (1). Wild-type  $\alpha_{1B}$ -AR was expressed under the control of the murine  $\alpha$ -myosin heavy chain promoter, which is highly specific and directs transgene expression to the myocardium. The use of this promoter rules out the involvement of peripheral effects in the cardiac phenotype studied. The level of  $\alpha_{1B}$ -AR overexpression (43-fold) has been determined previously (29). SJL heterozygous transgenic male mice ( $\alpha_{1B}$ -AR) at two different ages, 9-12 months (9-12 mo) (presenting dilated cardiomyopathy and heart failure) and 2-3 months (2-3 mo) (without cardiac remodeling) and non-transgenic age- and sex-matched littermates (non-Tg) were used throughout this

study. All experiments were conducted in accordance to the guidelines published by the Canadian Council of Animal Care.

### 3.2.3.2 Ventricular myocytes isolation

Non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice were heparinized (1 U/kg; IP) 20 min prior to sacrifice, anaesthetized by inhalation of isoflurane and then killed by cervical dislocation. The ventricular myocytes isolation protocol has been previously described (47). Briefly, the hearts were rapidly removed, and retrogradely perfused (2 ml/min) through the aorta on a modified Langendorff apparatus with the following solutions: (i) 5 minutes with HEPES-buffered Tyrode solution containing (in mM): 130 NaCl; 5.4 KCl; 1 CaCl<sub>2</sub>; 1 MgCl<sub>2</sub>; 0.3 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10 HEPES; 5.5 glucose (pH adjusted to 7.4 with NaOH), (ii) 10 min with Tyrode solution without Ca<sup>2+</sup> ("Ca<sup>2+</sup>-free"), (iii) 20 min with Ca<sup>2+</sup>-free Tyrode solution containing 73.7 U/ml collagenase type 2 (Worthington Co. Ltd, Freehold, NJ, USA); 0.1% bovine serum albumin (BSA; Fraction V, Sigma Chemicals Co., St. Louis, Mo, USA); 20 mM taurine and 30  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, and (iv) 5 min 30 sec with a "KB" solution (23) containing (in mM): 100 K<sup>+</sup>-glutamate; 10 K<sup>+</sup>-aspartate; 25 KCl; 10 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2 MgSO<sub>4</sub>; 20 taurine; 5 creatine base; 0.5 EGTA; 5 HEPES; 0.1% BSA; 20 glucose (pH adjusted to 7.2 with KOH). The temperature of the perfusion was maintained at 37  $\pm$  1°C. At the end of the perfusion, the right ventricular free wall was dissected from the heart and placed in KB solution. The tissue was then minced and triturated for 10 min to free individual ventricular myocytes. Myocytes were stored in KB solution at 4 °C until used.

### 3.2.3.3 Electrophysiology

**Cellular electrophysiology.** The whole-cell voltage and current recording methods, data acquisition, voltage-clamp protocols and analysis methods have been described previously (5). Whole-cell voltage and current-clamp recordings were performed on the myocytes using the ruptured patch-clamp technique with a patch-clamp amplifier, Axopatch 200 B (Axon Instruments, Foster City, USA). The data were recorded and analyzed with pClamp

8.0 software (Axon Instruments, Foster City, USA). Series resistance ( $R_s$ ) was between 4-8  $M\Omega$ ; and compensation was applied to reduce  $R_s$  by 80-90%. Voltage-clamp currents were low-pass filtered at 1 kHz with a 4-pole Bessel analog filter and digitized at 4-10 kHz. To account for differences in cell size, current amplitudes were normalized to the cell capacitance, and expressed as densities (pA/pF). Capacitative transients elicited by a 10 mV depolarizing step from a holding potential of -80 mV were recorded at 25 kHz (filtered at 10 kHz). Cell capacitance was measured by integrating the surface area of these capacitive transient. All patch-clamp experiments were carried out at room temperature (20-22°C).

To record action potential and  $K^+$  currents, pipettes were filled with the following solution (mM): 110  $K^+$ -aspartate, 20 KCl, 8 NaCl, 1  $MgCl_2$ , 1  $CaCl_2$ , 10 BAPTA, 4  $K_2ATP$  and 10 HEPES (pH 7.2 with KOH), that gave resistances in the range of 1.5-4  $M\Omega$  to the pipettes. Cells were continuously perfused with oxygenated Tyrode solution. To compensate for the patch pipette-bath liquid junction potential ( $K^+$ -aspartate) recorded membrane potentials were corrected by -10 mV.

**Action potential recordings.** Action potentials were recorded at frequency rates of 1 to 4 Hz with the whole-cell current-clamp protocol by injection of brief (1-3 ms) stimulus currents (0.4-0.7 nA). The action potential durations of non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mouse ventricular myocytes were measured at 20, 50 and 90% of repolarization.

**$K^+$  currents recordings.** Current-voltage relationship for the total  $K^+$  current ( $I_{peak}$ ) was constructed from the current elicited by a series of 500 ms test potentials varying from -110 mV to +50 mV in 10 mV increments from a holding potential of -80 mV at a frequency rate of 0.1 Hz. The current density of the inward rectifier  $K^+$  current ( $I_{K1}$ ) was determined at the end of the 500 ms voltage steps ranging from -110 mV to -40 mV. We then examined the contribution of individual outward  $K^+$  currents. First, we eliminated the transient portion (the  $Ca^{2+}$ -independent transient outward  $K^+$  current,  $I_{to}$ ) by applying an inactivating prepulse (100 ms, -40 mV) preceding the main activation steps. The current remaining after

inactivation of  $I_{to}$  is denoted  $I_{Kslow}$  and is composed of  $I_{Kur}$  (the ultrarapid delayed rectifier  $K^+$  current or the 4-aminopyridine (4-AP)-sensitive component) and  $I_{ss}$  (the steady-state outward  $K^+$  current or the 4-AP-resistant component). We then compared the density of  $I_{to}$  obtained by subtracting the current traces measured with and without the inactivating prepulse. We applied 100  $\mu$ M 4-AP (which blocks  $I_{Kur}$ ) (5) in combination with an inactivating prepulse (which blocks  $I_{to}$ ) to recorded the 4-AP resistant  $K^+$  current, or  $I_{ss}$ . We then measured  $I_{Kur}$  by subtracting currents recorded in the absence or presence of 4-AP ( $I_{Kslow} - I_{ss}$ ). The current densities of each of the three components of the outward  $K^+$  current were determined at the peak current. The description and validation of these pharmacological and biophysical methods has been previously published (5).

**Surface electrocardiograms (ECG).** Mice were anaesthetized with isoflurane. Mouse body temperature was maintained at 37°C using a heating pad. Platinum electrodes were placed subcutaneously and surface ECG were acquired in lead I configuration as described previously (6; 7). Acquisition was performed using the Biopac System MP100 at a rate of 2 kHz. The signal was amplified, filtered at 100 Hz (low-pass) and 60 KHz (notch filter). Data were analyzed using ECG auto 1.7 (AcqKnowledge 3.7). The QT intervals were calculated manually by a blinded observer from signal averaged ECG recordings. The QTc interval was calculated using a modified Bazett's correction formula,  $QTc = QT/(RR/100)^{1/2}$  (32). Spontaneous ventricular arrhythmias were recorded using surface ECG recordings.

**Telemetry.** In addition, telemetry was also used to record and monitor spontaneous ventricular arrhythmias in conscious free moving unanaesthetized mice. Data was acquired with an implantable OpenHeart® radiofrequency transmitter, (Data Sciences International, Arden Hills, MN). The leads for the transmitters were threaded subcutaneously to the appropriate position and sutured in place to prevent movement. The positive transmitter lead was located on the left anterior chest wall above the apex of the heart and the negative

lead was located on the right shoulder. ECG lead placement represents the conventional lead II position. Recordings were analyzed with ECG Auto (version 1.7, EMKA technologies, Paris, France).

#### **3.2.3.4 Western blots analysis**

Protocols used for isolation of sarcolemmal-enriched protein and Western blot analysis were identical to those previously reported (7; 30; 47). Proteins were prepared from ventricles of non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice (1 heart / sample) homogenized in TE buffer (pH 7.4) containing protease inhibitors (Leupeptin, Aprotinin, Benzamidine, PMSF, and  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ). The homogenate was centrifuged at 10,000 g. The supernatant was ultracentrifuged 3 times at 200,000 g for 20 min. The pellet was resuspended in TE buffer containing the protease inhibitors and 0.6 M KCl to dissolve contractile proteins. Proteins (100  $\mu\text{g}$ ) were separated on a 10% SDS-PAGE, transferred on nitrocellulose membranes (Hybond<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup>, Amersham Pharmacia Biotech) and blocked in TTBS 0.1% supplemented with 5% non-fat dried milk (NFDM) for 2 hours at room temperature (RT). Membranes were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies directed against Kv1.5 (Upstate Biotechnology, Lake Placid), Kv1.4, Kv2.1, Kv4.2, Kv4.3, Kir2.1, TASK-1 (Alomone Labs, Israel) and KChIP2 antibody (Santa Cruz Biotech, CA, USA). After washing 3 times for 10 minutes with TTBS 0.1% / 5% NFDM, membranes were incubated with secondary antibody (anti-rabbit-HRP or anti-goat-HRP conjugated IgG) for 3 hours at RT. Membranes were then washed 3 times for 10 minutes with TTBS 0.1% before being treated with chemiluminescent substrate and exposed to autoradiography film. Ponceau S was used to confirm uniformity of the protein loading and transfer. Bands were quantified by densitometry using the Quantity One (Bio-Rad, CA, USA).

#### **3.2.3.5 Real time RT-PCR**

Real-time RT-PCR (qPCR) was performed using the technique published previously (16). Ventricular total RNA was isolated using RNeasy Fibrous Tissue kit (Qiagen) and treated with DNase I to prevent genomic DNA contamination. cDNA fragments were synthesized



by RT-PCR using the cloned AMV reverse transcriptase (InVitrogen). Primers specific to K<sup>+</sup> channel / accessory protein (Kv1.5, Kv2.1, Kv4.2 and KChIP2) were designed and tested to assure an amplification of a unique cDNA product. Primer sequences were Kv1.5 forward: GGTGTTCCGAATCTTCAAGC, reverse: GTCTGCCTCTGCGAAGTAG; Kv2.1 forward: CACGTGCTGTGCTGAGAAGAG, reverse: GCAATGGTGGAGAGGA CAATG; Kv4.2 forward: GTGATGACAGACAATGAGGATG, reverse: GGTGAACTT GCTTGCTGAAG; KChIP2 forward: GTTTCCTCAAGCTGCTGCCGTGCTG, reverse: GTGGCACACCGTGGAAGTTC. Sequence analysis was performed on all PCR-generated cDNA fragments to ascertain the specificity of the products. The real-time PCR reaction was carried out with Platinum SYBR Green qPCR Supermix (InVitrogen) using a real-time PCR system (MX3005P qPCR system, Stratagene). The PCR reactions were cycled 40 times using a 3-step cycle procedure (denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 50°C for 45 s, elongation at 72°C for 45 s) after an initial stage at 95°C for 10 min. mRNA expression was quantified relative to murine cyclophilin. To assure the validity of the results, the linearity and the efficiency criteria were thoroughly respected.

### **3.2.3.6 Statistical analysis**

Results are expressed as mean  $\pm$  standard error (SEM). An unpaired Student t-test was used to compare mean data. The results were considered statistically significant when P-values were less than 0.05.

## **3.2.4 Results**

### **3.2.4.1 Prolongation of QTc interval in 9-12 months $\alpha_{1B}$ -AR mice**

Surface ECG parameters obtained on anaesthetized mice were compared between non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice. Figure 1A presents typical examples of lead I surface ECG recorded in non-Tg (left panel) and  $\alpha_{1B}$ -AR (right panel) mice. These examples show that the QT

interval was much longer in  $\alpha_{1B}$ -AR mice compared to non-Tg mice. Panel B of Figure 1 presents mean data for heart rate (HR), QT and rate corrected QT (QTc) intervals. These data indicate that although the heart rate was significantly slower in the  $\alpha_{1B}$ -AR group, both the QT and QTc intervals from  $\alpha_{1B}$ -AR mice were markedly prolonged compared to those from non-Tg animals. The prolonged QTc intervals clearly indicate that the slower heart rate of the transgenic animals is not sufficient to explain the longer QT intervals.

#### **3.2.4.2 Longer action potential duration in 9-12 months $\alpha_{1B}$ -AR mice**

Thus, to establish whether the increase in the QTc interval reflected a lengthening of action potential duration (APD), current-clamp recordings were obtained on enzymatically isolated ventricular myocytes from non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice. There was a marked increase in the APD in  $\alpha_{1B}$ -AR myocytes compared to their littermate controls as illustrated by the data presented in Figure 1C-D. Typical examples of action potentials recorded at 4 Hz in non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR ventricular myocytes are shown in Figure 1C. Panel D of Figure 2 summarizes the mean APD data obtained in both groups. These bar graphs compare the APD recorded in non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR myocytes measured at 20% (APD<sub>20</sub>), 50% (APD<sub>50</sub>), and 90% (APD<sub>90</sub>) of repolarization. APD<sub>20</sub> (non-Tg:  $2.9 \pm 0.1$  ms vs  $\alpha_{1B}$ -AR:  $6.1 \pm 0.7$  ms), APD<sub>50</sub> (non-Tg:  $4.7 \pm 0.2$  ms vs  $\alpha_{1B}$ -AR:  $20.1 \pm 4.0$  ms) and APD<sub>90</sub> (non-Tg:  $18.9 \pm 1.0$  ms vs  $\alpha_{1B}$ -AR:  $52.4 \pm 5.8$  ms) were all significantly longer in the  $\alpha_{1B}$ -AR group compared to the non-Tg mice ( $p < 0.05$ ). To determine whether the prolongation of the APD was rate dependent we also recorded APD at different frequency rates (0.1, 1, 2, 3 and 4 Hz). At lower frequencies, APDs were also significantly longer in  $\alpha_{1B}$ -AR compared to non-Tg mice.

#### **3.2.4.3 Alterations in $K^+$ currents in 9-12 months $\alpha_{1B}$ -AR mouse ventricular myocytes**

Since APD is mainly determined by repolarizing  $K^+$  currents, these conductances were recorded from freshly isolated ventricular myocytes using the whole-cell patch-clamp

technique in the voltage-clamp configuration. Figure 2A illustrates typical examples of a family of total  $K^+$  current ( $I_{peak}$ ) recorded from non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR ventricular myocytes. Current amplitudes were normalized to the respective cell capacitance and expressed as densities (pA/pF). Figure 2B is a plot of the mean current-voltage (I-V) relationships for the peak inward or outward current obtained from 14 non-Tg and 20  $\alpha_{1B}$ -AR cells. These superimposed current records demonstrate that the total outward  $K^+$  current in myocytes from  $\alpha_{1B}$ -AR was significantly decreased (Figure 2B). For instance, the mean current densities of the total outward current ( $I_{peak}$ ) measured at +30 mV were  $71.1 \pm 4.7$  pA/pF (n=14) in non-Tg and  $26.4 \pm 2.0$  pA/pF (n=20) in  $\alpha_{1B}$ -AR myocytes ( $p = 3.7 \times 10^{-8}$ ). Since  $I_{peak}$  is composed of  $I_{to}$ ,  $I_{ss}$  and  $I_{Kur}$  (5), we examined these individual components of the outward  $K^+$  currents to evaluate the contribution of each of these currents on the delayed repolarization observed in  $\alpha_{1B}$ -AR mice.

***Ca<sup>2+</sup>-independent transient outward K<sup>+</sup> current,  $I_{to}$ .*** The superimposed current records in Figure 3A demonstrate that  $I_{to}$  in myocytes from  $\alpha_{1B}$ -AR mice was significantly decreased compared to non-Tg. The mean I-V plots on the right panel show that the density of  $I_{to}$  in  $\alpha_{1B}$ -AR myocytes (at +30 mV:  $12.9 \pm 1.3$  pA/pF, n=19) was substantially reduced compared to non-Tg myocytes (at +30 mV:  $40.5 \pm 3.0$  pA/pF, n=14) ( $p = 6.7 \times 10^{-8}$ ).

***Ultrarapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current,  $I_{Kur}$ .*** The family of superimposed current records presented in Figure 3B corresponds to the 4-AP-sensitive current,  $I_{Kur}$ , obtained in ventricular myocytes from both groups. As illustrated in these examples,  $I_{Kur}$  from  $\alpha_{1B}$ -AR mice was smaller compared to that from littermate control animals. The mean IV curves (right panel) show that  $I_{Kur}$  in cells from  $\alpha_{1B}$ -AR animals was significantly smaller (at +30 mV,  $9.4 \pm 1.0$  pA/pF, n=14) than that in non-Tg myocytes (at +30 mV,  $26.0 \pm 3.6$  pA/pF, n=9) ( $p = 0.001$ ).

***Steady-state outward K<sup>+</sup> current,  $I_{ss}$ .*** Combining the inactivating protocol with the use of 4-AP that selectively blocks  $I_{Kur}$ , we compared the magnitude of  $I_{ss}$  between control and

$\alpha_{1B}$ -AR myocytes (Figure 3C). As illustrated by the representative examples presented on the left panel and the mean I-V plots for  $I_{ss}$  (right panel), the density of  $I_{ss}$  was significantly decreased in  $\alpha_{1B}$ -AR mice (at +30 mV:  $5.2 \pm 0.3$  pA/pF, n=14) compared to the non-Tg ( $8.7 \pm 0.7$  pA/pF, n=9) (p=0.0004).

***Inwardly rectifying  $K^+$  current,  $I_{K1}$ .*** In contrast,  $I_{K1}$ , the repolarizing current that also maintains resting membrane potential was not changed when non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR myocytes were compared. Indeed, the I-V plots in Figures 3B and 4C illustrate that the density of  $I_{K1}$  between non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR were not different (at -110 mV, non-Tg:  $-17.5 \pm 0.9$  pA/pF, n=14;  $\alpha_{1B}$ -AR:  $-15.8 \pm 0.8$  pA/pF, n=20; p=0.157). Along with these data, there was no significant difference in the resting membrane potential between the two groups (non-Tg:  $-71.8 \pm 0.5$  mV, n=19;  $\alpha_{1B}$ -AR:  $-73.5 \pm 0.8$  mV, n=22).

Taken together, these results suggest that a reduction in the density of the three components of the outward  $K^+$  current ( $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$ ,  $I_{ss}$ ) are responsible for the action potential prolongation seen in  $\alpha_{1B}$ -AR mice.

***Voltage-dependence of steady-state inactivation of  $I_{to}$  and  $I_{Kur}$ .*** Figure 4A compares the voltage-dependence of steady-state inactivation of  $I_{to}$  in non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR ventricular myocytes, measured using a two-step voltage-clamp protocol. The midpoint potential ( $V_{1/2}$ ) from the Boltzmann equation fit to mean control data was  $V_{1/2} = -54.3 \pm 1$  mV, and the slope factor (k) was  $6.2 \pm 0.9$  mV. Measurements of steady-state inactivation of  $I_{to}$  in  $\alpha_{1B}$ -AR mouse ventricular cells yielded a  $V_{1/2}$  of  $-55.9 \pm 1.6$  mV, and a k value of  $5.2 \pm 1.1$  mV. Thus, the voltage-dependence of steady-state inactivation of  $I_{to}$  in  $\alpha_{1B}$ -AR mouse ventricular myocytes was comparable to that in control myocytes.

The steady-state inactivation of  $I_{Kur}$  was measured with a two-pulse protocol similar to that used for  $I_{to}$ , except that pulse durations were longer due to the much slower inactivation kinetics of  $I_{Kur}$  (see insets on Figure 4). In addition, a 100 ms pulse at -40mV was

interposed between the inactivating and test pulses to inactivate  $I_{to}$ . Figure 4B compares typical examples of steady-state inactivation of  $I_{Kur}$  measured in control and  $\alpha_{1B}$ -AR ventricular myocytes. The Boltzmann equations fitted to these data are presented on the right panel. In non-Tg cells,  $V_{1/2}$  was  $-48.3 \pm 3.5$  mV compared to  $-47.7 \pm 1.9$  mV for the  $\alpha_{1B}$ -AR group. The slope factor was  $8.0 \pm 1.1$  mV for the non-Tg and  $8.5 \pm 1.2$  mV for the  $\alpha_{1B}$ -AR group. Thus, no significant difference was found in the steady-state inactivation of  $I_{Kur}$  between the two groups.

***Recovery from inactivation of  $I_{to}$  and  $I_{Kur}$***  Figure 5A summarizes the data for the recovery from inactivation of  $I_{to}$  in non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mouse ventricular myocytes. The time course of reactivation of  $I_{to}$  was best fitted by single exponential equations with time constants of  $57 \pm 15$  ms for control myocytes and  $530 \pm 185$  ms for the  $\alpha_{1B}$ -AR myocytes at -80 mV ( $p=0.005$ ). These data indicate that in  $\alpha_{1B}$ -AR ventricular myocytes  $I_{to}$  recovered from inactivation much more slowly than in myocytes obtained from non-Tg animals. In contrast,  $I_{Kur}$  recovered from inactivation at a similar rate in both groups with time constants of  $447 \pm 62$  ms in the controls compared to  $354 \pm 77$  ms ( $p=0.33$ ) in the  $\alpha_{1B}$ -AR group, as shown in Figure 5B.

#### **3.2.4.4 Reduction in $K^+$ channels expression in 9-12 months $\alpha_{1B}$ -AR mouse ventricle**

Western blot experiments were undertaken to compare the protein expression level of Kv1.5 (encoding  $I_{Kur}$ ) (31), Kv4.2 and Kv4.3 (underlying  $I_{to}$ ) (3; 49), Kv2.1 (responsible for  $I_{ss}$ ) (50) and Kir2.1 (underlying  $I_{K1}$ ) (51) in non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR ventricle. The marked change in recovery from inactivation of  $I_{to}$  suggests that Kv1.4 and/or KChIP2 also may be involved. Indeed, an up-regulation of Kv1.4 expression could in part contribute to the slower  $I_{to}$  reactivation kinetics (18; 21). Similarly, since it has been reported that the accessory subunit KChIP2 can associate with Kv4.2 and Kv4.3 to increase the density of  $I_{to}$  and accelerate its reactivation (26; 34; 42), we also included KChIP2 in these Western blot analysis. These experiments were carried out on sarcolemmal enriched fractions, except for

KChIP2, which was examined using cytosolic proteins (30). In the  $\alpha_{1B}$ -AR mice, there was a marked reduction in the protein expression of Kv1.5, Kv2.1, Kv4.2 and KChIP2. In contrast, Kv4.3 and Kir2.1 were similar between non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR ventricles (Figure 6A). The protein expression of Kv1.4 was increased in  $\alpha_{1B}$ -AR mice compared to controls.

To determine whether the reduction in the protein expression of Kv1.5, Kv4.2, KChIP2 and Kv2.1 was associated with a parallel reduction of the mRNA levels, real-time RT-PCR experiments were carried out on these subunits. Consistent with the protein expression studies of the underlying  $K^+$  channels, the real-time RT-PCR experiments revealed a significant reduction of the transcripts for Kv1.5, Kv4.2, KChIP2 and Kv2.1 in the ventricles of  $\alpha_{1B}$ -AR mice compared to the non-Tg mice. (Figure 6B).

#### **3.2.4.5 Alterations in cardiac rhythm in 9-12 months $\alpha_{1B}$ -AR mice**

Figure 7 depicts ECG traces recorded in 9-12 mo  $\alpha_{1B}$ -AR and littermate control mice. While none of the 24 control mice studied had rhythm abnormalities (panel A), a variety of spontaneous ventricular arrhythmias were observed in 9-12 mo old  $\alpha_{1B}$ -AR mice using both surface ECG recordings and telemetry monitoring. Figures 7B-E show different irregular rhythms present in  $\alpha_{1B}$ -AR mice: Episodes of arrhythmias were reported on 24 out of 31 (77%)  $\alpha_{1B}$ -AR mice. Of these, 19 out of 26 (73%) mice experienced spontaneous arrhythmia during a 2-minute surface ECG recording and all 5  $\alpha_{1B}$ -AR mice subjected to a 24-hour telemetry monitoring exhibited irregular rhythms. These spontaneous arrhythmias were recorded throughout the 24-hour recording period and each episode lasted between 100 msec and 2.5 minutes.

#### **3.2.4.6 Characterization of younger $\alpha_{1B}$ -AR mice**

As specified earlier, the mice used in the experiments described above were 9-12 mo old and showed clear signs of heart failure (1; 28). A heart failure phenotype could potentially affect ventricular repolarization and QT interval. This might contribute, at least in part, to

the observed electrophysiological alterations in  $\alpha_{1B}$ -AR myocytes. Using echocardiographic analyses on  $\alpha_{1B}$ -AR mice at 3, 6, and 9 months of age, Lemire *et al.* previously reported that younger  $\alpha_{1B}$ -AR mice (3 months) do not present signs of heart failure as opposed to the 9 months animals (28). Accordingly, we carried out electrophysiological and expression studies using 2-3 mo old  $\alpha_{1B}$ -AR mice to ascertain that the arrhythmogenic changes described in the older transgenic mice were not the result of alterations associated with end-stage heart failure, but rather due to chronic  $\alpha_1$ -AR activity in the transgenic hearts.

#### **3.2.4.7 Younger $\alpha_{1B}$ -AR present cardiac arrhythmia and delayed ventricular repolarization**

Results presented in Figures 8 and 9 indicated that 2-3 mo  $\alpha_{1B}$ -AR mice also present cardiac arrhythmias and delayed repolarization. Figure 8 illustrates ECG recordings obtained from 2-3 mo control and  $\alpha_{1B}$ -AR mice. None of the 7 control mice tested had rhythm disturbances (Figure 8A). In contrast, 5 out of 10 (50%)  $\alpha_{1B}$ -AR mice subjected to 2 minutes surface ECG recording exhibited spontaneous arrhythmia. In addition, telemetry monitoring of young  $\alpha_{1B}$ -AR mice revealed spontaneous arrhythmias in 2/2 young transgenic mice tested. These arrhythmias were similar to those observed in the older  $\alpha_{1B}$ -AR animals. However, these events were seen more frequent and were more sustained in the older transgenic mice compared to the younger  $\alpha_{1B}$ -AR animals. For instance, in the 2-3 mo  $\alpha_{1B}$ -AR mice, the longest arrhythmia lasted 15 seconds as opposed to 2.5 minutes in the older transgenic animals.

Compared to their age-matched littermate controls, the 2-3 mo  $\alpha_{1B}$ -AR mice had longer QT interval (non-Tg:  $49.3 \pm 2.5$  ms,  $\alpha_{1B}$ -AR:  $80.3 \pm 5.9$  ms,  $p=0.0002$ ), QTc interval (non-Tg:  $42.3 \pm 1.6$  ms,  $\alpha_{1B}$ -AR:  $58.1 \pm 4.2$  ms,  $p=0.002$ ) and APD (in ms) (APD<sub>20</sub>, non-Tg:  $2.7 \pm 0.1$  ;  $\alpha_{1B}$ -AR:  $3.8 \pm 0.2$  ;  $p=0.0001$ ) (APD<sub>50</sub>, non-Tg:  $5.5 \pm 0.5$  ;  $\alpha_{1B}$ -AR:  $10.3 \pm 0.8$  ;  $p <$

0.00001) ( $APD_{90}$ , non-Tg:  $19.2 \pm 1.0$  ;  $\alpha_{1B}$ -AR:  $34.1 \pm 1.8$  ;  $p < 0.00001$ ) (Figure 9A and B).

#### 3.2.4.8 Younger $\alpha_{1B}$ -AR mice also exhibit reduced outward $K^+$ currents

Furthermore, similar to what was seen in the older mice, the 2-3-mo  $\alpha_{1B}$ -AR mice exhibited a decrease in density of the outward component of the total  $K^+$  current ( $I_{peak}$ ) (at +30mV; non-Tg:  $54.9 \pm 4.3$  pA/pF and  $\alpha_{1B}$ -AR:  $30.9 \pm 1.4$  pA/pF,  $p = 0.0001$ ) (Figure 9 D). Separation of the individual components of  $I_{peak}$  reveals that the three outward  $K^+$  currents were reduced in the young  $\alpha_{1B}$ -AR mice compared to their age-matched littermates (at +30mV,  $I_{to}$ : non-Tg:  $28.7 \pm 2.5$  pA/pF,  $\alpha_{1B}$ -AR:  $13.6 \pm 1.2$  pA/pF,  $p = 0.0001$  ;  $I_{Kur}$ : non-Tg:  $21.8 \pm 3.2$  pA/pF,  $\alpha_{1B}$ -AR:  $11.1 \pm 0.9$  pA/pF,  $p = 0.009$ ;  $I_{ss}$ : non-Tg:  $11.0 \pm 0.5$  pA/pF,  $\alpha_{1B}$ -AR:  $6.7 \pm 0.6$  pA/pF,  $p = 0.00003$ ) (Figure 10 A, B and C). As for the older mice,  $I_{K1}$  was also comparable between young  $\alpha_{1B}$ -AR and non-Tg mice (at -110mV, non-Tg:  $-18.3 \pm 1.4$  pA/pF,  $\alpha_{1B}$ -AR:  $-16.6 \pm 0.9$  pA/pF,  $p = 0.3$ ) (Figure 9C and 10C). In line with this finding, resting membrane potentials were also similar between the two groups (non-Tg:  $-73.0 \pm 0.5$  mV,  $n=22$ ;  $\alpha_{1B}$ -AR:  $-75.5 \pm 0.5$  mV,  $n=21$ ).

#### 3.2.4.9 Reduced $K^+$ channel expression in young $\alpha_{1B}$ -AR mouse ventricle

Using the younger  $\alpha_{1B}$ -AR mice, we also examined the expression of the different  $K^+$  channel and accessory subunits that were changed in older  $\alpha_{1B}$ -AR ventricles (Figure 7). At 2-3 mo of age, protein and mRNA expression of Kv1.5 and KChIP2 were decreased in transgenic ventricles compared to non-Tg tissues (Figure 11 A and B). As for Kv4.2, the expression level of this channel was reduced only at the protein level (Figure 11 A and B) in the younger animals. Similar to what was seen in the older group, Kv1.4 protein expression was increased in young  $\alpha_{1B}$ -AR mice compared to the non-transgenic controls. However, as opposed to the results obtained for Kv2.1 in the older  $\alpha_{1B}$ -AR mice, in the younger animals the protein and mRNA expression of Kv2.1 was similar between control and transgenic animals. To address the possibility that the decrease in  $I_{ss}$  seen in the young



$\alpha_{1B}$ -AR mice could be due to decreased expression of other channels than Kv2.1, we performed additional experiments to address this possible alternative. Since recently published studies suggested that part of  $I_{ss}$  could be generated by TASK-1 channel (9; 35), we verified if the protein expression of this channel was altered in the  $\alpha_{1B}$ -AR mice (Figure 12). These Western blot analysis clearly showed that the protein expression of TASK-1 is similar between control and  $\alpha_{1B}$ -AR mice of both age groups. These new data strongly suggest that TASK-1 does not contribute to  $I_{ss}$  in mouse ventricular myocytes.

These findings clearly show that electrical remodeling is already present in younger transgenic animals. However, it appears to be somewhat less pronounced than in older mice. These data support an important role for the overexpression of  $\alpha_{1B}$ -AR as a major cause of the repolarization defects and increased incidence of arrhythmias in the Tg mice. In addition, the further reduction of the transcript levels of the  $K^+$  channels and the worsening of the electrical remodeling that occurs in the older animals might be attributed to intracellular signalling linked to cardiac remodeling or failure.

### 3.2.5 Discussion

#### Summary of main findings

This study is the first to characterize the electrophysiological consequences of overexpressing the wild-type  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor in the myocardium of the mouse. Results obtained in 9-12 mo  $\alpha_{1B}$ -AR mice revealed that chronic  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor activity remodels cardiac expression of  $K^+$  channel subunits at the mRNA and protein level. These changes are associated with delayed repolarization and spontaneous ventricular arrhythmias. These findings support the hypothesis that chronic  $\alpha_{1B}$ -adrenergic activation is a potentially important control mechanism for cardiac arrhythmias. Since the presence of heart failure in aged  $\alpha_{1B}$ -AR mice could also be associated with delayed repolarization, it was important to determine whether this phenotype is directly related to the transgene and not to the heart failure. The electrical remodeling observed in the younger (2-3 mo)  $\alpha_{1B}$ -AR

mice that do not yet have characteristics of heart failure, provides further evidence in support of an important role for  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptors in regulating the expression of cardiac potassium channels and arrhythmogenesis. However, since the alterations in the young mice appears to be slightly less important than in the older transgenic animals, one cannot exclude that part of the electrical remodeling in the older mice could be a consequence of heart failure.

### **Alteration of cardiac repolarization in heart disease**

Previous studies have demonstrated that the late-onset heart failure phenotype observed in the wild-type  $\alpha_{1B}$ -AR mice is not preceded by longstanding cardiac hypertrophy (17; 28). Consistent with the lack of hypertrophy are the similar values of the cell capacitances obtained in both aged control and  $\alpha_{1B}$ -AR mice (2-3 mo: non-Tg =  $91 \pm 4$  pF, n=17;  $\alpha_{1B}$ -AR =  $93 \pm 4$  pF, n=21) (9-12 mo: non-Tg =  $214 \pm 8$  pF, n=20;  $\alpha_{1B}$ -AR =  $186 \pm 15$  pF, n=20). These observations provide further evidence that the changes observed in the transgenic myocytes do not result from ventricular hypertrophy and remodeling. In support of this, we recently demonstrated that cardiac-specific overexpression of angiotensin type 1 receptor in a transgenic mouse model leads to delayed repolarization phenotype that did not occur as a consequence of hypertrophy (37). Besides, there is growing evidence suggesting that the reduction of  $K^+$  currents and subsequent prolongation of APD have been proposed as the first steps in the cascade of events leading to ventricular remodeling and heart failure (25; 27; 41; 44; 52).

### **Potential mechanisms underlying the reduction of outward $K^+$ currents**

The lower density of  $I_{to}$  was associated with a reduction of Kv4.2 and KChIP2 expression as well as a slower reactivation time of the current. In support of these findings, previous studies have reported that currents generated by Kv channels that are affected by neurohormonal factors (e.g.,  $\alpha_1$ -adrenergic agonists and angiotensin II) showed alteration in the expression levels and kinetics of the currents (22; 33). KChIP2 has been proposed to

interact with the Kv4.2 subunit to facilitate its trafficking from the endoplasmic reticulum to the surface membrane (26; 34; 42) and accelerate recovery from inactivation of  $I_{to}$  (26). Thus, the lower expression of KChIP2 in old and young transgenic animals could contribute to explain the reduced density of  $I_{to}$  and its slower reactivation time. We previously reported that the pattern of KChIP2 mRNA expression was similar to that observed for Kv4.2 during postnatal development in mouse ventricle, suggesting that the increases in KChIP2 mRNA between day-1 and adulthood may be responsible in part for the increase  $I_{to}$  density observed during this time period (16). In addition to the changes in KChIP2, the increased expression of Kv1.4 could also contribute to the slower reactivation kinetics of  $I_{to}$  in the transgenic animals.

Although both Kv4.2 and Kv4.3  $K^+$  channel isoforms contribute to  $I_{to}$  in mouse ventricles (3; 5; 14; 21; 43; 49), we show here that a reduction restricted only to Kv4.2  $\alpha$  subunit resulted in a lower  $I_{to}$  density. It is interesting to note that under different physiological or pathological conditions, changes in  $I_{to}$  could be associated with changes in Kv4.2 or Kv4.3. For example, Eghbali *et al.* have shown that in pregnant mice a specific reduction of Kv4.3 was responsible for the lower density of  $I_{to}$  (11). Thus, it seems that a reduction in one of the underlying isoforms of  $I_{to}$  is sufficient to produce a parallel effect on the density of  $I_{to}$ . However, the reasons why under different conditions only one specific isoform is affected remain unknown.

Expression studies of mRNA transcript and protein level indicate that changes in the current density of the three outward  $K^+$  currents are most likely mediated by transcriptional and/or post-transcriptional mechanisms. The reduction of  $I_{Kur}$  could be explained by a lower Kv1.5 mRNA levels observed in both aged groups supporting a transcriptional regulation of this channel by  $\alpha_{1B}$ -AR stimulation. The expression level of both Kv4.2 and KChIP2 was decreased at the protein and mRNA level in the older transgenic mice. However, although the protein and mRNA expression of KChIP2 were both reduced in the younger  $\alpha_{1B}$ -AR mice, only the protein level of Kv4.2 was decreased in the younger

animals. Thus, these data suggest that the decrease in  $I_{to}$  is most likely explained by a combination of post-transcriptional (Kv4.2) and transcriptional (KChIP2) regulation. Our results indicate that  $I_{ss}$  is decreased in old and young  $\alpha_{1B}$ -AR mice. The reduction in the older animals is associated with a reduction in Kv2.1 protein and mRNA expression. Surprisingly, in the young  $\alpha_{1B}$ -AR mice the decrease in the current density of  $I_{ss}$  is not paralleled with a reduction of Kv2.1 expression. It is possible that the reduction of  $I_{ss}$  would be due to decreased expression of other channels than Kv2.1. However, our Western data showed that TASK-1 protein expression was similar between controls and  $\alpha_{1B}$ -AR mice of both age groups and ruled out a possible involvement of TASK-1 in the generation of  $I_{ss}$  in mouse ventricle. Alternatively, the decreased expression of channels other than Kv2.1 and TASK-1 remains a possible explanation.

#### **$I_{K1}$ was not affected in $\alpha_{1B}$ -AR mice**

Interestingly, the only  $K^+$  current that was not different between the  $\alpha_{1B}$ -AR and the non-Tg mice was  $I_{K1}$ . Consistent with that the resting membrane potential and the protein level of Kir2.1 were also similar between the two groups. The fact that  $I_{K1}$  is not affected by  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation supports the hypothesis that chronic activation of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors causes the reduction of  $K^+$  currents that activate early in the repolarization process, prolonging the APD at the plateau level and providing an opportunity for activating  $Ca^{2+}$  current and increasing intracellular  $Ca^{2+}$ .  $I_{K1}$  is not involved in that process since its activation produces a prolongation of the APD only at the late phase of the action potential. Moreover, it has been documented in the literature that in cardiomyocytes isolated from rats, rabbits and humans (where  $I_{to}$  is prominent),  $\alpha_1$ -adrenergic activation causes prolongation of the APD (13), but does not have a similar effect in guinea pig, (10; 40) a species where  $I_{to}$  is absent. These findings are also in support of the effects of  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation on  $K^+$  currents involved early in the repolarization process. In contrast to our  $I_{K1}$  results, it has been previously reported that the inward rectifier current could be decreased by acute exposure to  $\alpha_1$ -adrenergic agonists in rabbit ventricular

myocytes (12). Potential limitations with the pharmacological approach could contribute to explain this discrepancy (e.g., specificity of the agonists / antagonists). However, other factors such as differences in the underlying  $K^+$  channels or species differences could also explain these differences.

### **Limitations**

The data obtained in the younger animals indicate that most of the arrhythmogenic changes described here take place before the occurrence of heart failure strongly supporting the conclusion that these alterations are largely due to chronic  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor activity. However, since the young animals also present a less severe phenotype, one cannot exclude that part of the electrical remodeling of the older mice is a consequence of heart failure. In addition, other remodelings may also contribute to explain the occurrence of arrhythmias. Indeed, in addition to alterations in the repolarization process, the  $\alpha_{1B}$ -AR transgenic mice have a significantly slower heart rate (Figures 1 and 9), suggesting that the function and/or regulation of the sinoatrial node may also be affected by chronic  $\alpha_{1B}$ -AR activation. Other studies have also reported that chronic  $\alpha_{1B}$ -AR stimulation causes decreased heart rate (38). The slower heart rate observed in the  $\alpha_{1B}$ -AR transgenic mice could be due to sinus bradycardia or junctional rhythm. This might also contribute to the phenotype observed in the transgenic animals. This question will require additional study.

### **Conclusion**

The present study provides strong evidence suggesting that under pathological conditions  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor stimulation is associated with delayed repolarization and cardiac arrhythmias. Our voltage-clamp experiments along with expression studies revealed that a number of  $K^+$  currents /channels are downregulated in  $\alpha_{1B}$ -AR mice, suggesting a causal link to the observed phenotype of rhythm disturbances also reported here. This work improves our understanding of the mechanisms by which  $\alpha$ -adrenergic stimulation affects

cardiac excitability and cardiac repolarization and our awareness of basic mechanisms of action of autonomic control of cardiac arrhythmia.

**Acknowledgements**

This study was supported by an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR to CF. MOP:64621). C. Fiset is a Research Scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). K. Rivard is a recipient of a FRSQ Studentship. The authors are thankful to M.A. Lupien, F. Mercier, C. St-Michel, L.R. Villeneuve and M.A. Gillis for skilled technical assistance.

### 3.2.6 References

1. **Akhter SA, Milano CA, Shotwell KF, Cho MC, Rockman HA, Lefkowitz RJ and Koch WJ.** Transgenic mice with cardiac overexpression of  $\alpha 1B$ -adrenergic receptors. In vivo  $\alpha 1$ -adrenergic receptor-mediated regulation of  $\beta$ -adrenergic signaling. *J Biol Chem* 272: 21253-21259, 1997.
2. **Apkon M and Nerbonne JM.** Alpha 1-adrenergic agonists selectively suppress voltage-dependent  $K^+$  current in rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 8756-8760, 1988.
3. **Barry DM, Xu H, Schuessler RB and Nerbonne JM.** Functional knockout of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac remodelling in mice expressing a dominant-negative  $Kv4 \alpha$ -subunit. *Circ Res* 83: 560-567, 1998.
4. **Beuckelmann DJ, Nabauer M and Erdmann E.** Alterations of  $K^+$  currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 73: 379-385, 1993.
5. **Brouillette J, Clark RB, Giles WR and Fiset C.** Functional properties of  $K^+$  currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Physiol* 559: 777-798, 2004.
6. **Brouillette J, Rivard K, Lizotte E and Fiset C.** Sex and strain differences in adult mouse cardiac repolarization: importance of androgens. *Cardiovasc Res* 65: 148-157, 2005.
7. **Brouillette J, Trepanier-Boulay V and Fiset C.** Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *J Physiol* 546: 403-413, 2003.
8. **Cavalli A, Lattion AL, Hummler E, Nenniger M, Pedrazzini T, Aubert JF, Michel MC, Yang M, Lembo G, Vecchione C, Mostardini M, Schmidt A, Beermann F and**

- Cottechia S.** Decreased blood pressure response in mice deficient of the  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci* 94: 11589-11594, 1997.
- 9. Charpentier F.** Understanding the cardiac role of K2P channels: A new TASK for electrophysiologists. *Cardiovasc Res* 75: 5-6, 2007.
  - 10. Dirksen RT and Sheu SS.** Modulation of ventricular action potential by alpha 1-adrenoceptors and protein kinase C. *Am J Physiol* 258: H907-H911, 1990.
  - 11. Eghbali M, Deva R, Alioua A, Minosyan TY, Ruan H, Wang Y, Toro L and Stefani E.** Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res* 96: 1208-1216, 2005.
  - 12. Fedida D, Braun AP and Giles WR.** Alpha 1-adrenoceptors reduce background K<sup>+</sup> current in rabbit ventricular myocytes. *J Physiol* 441: 673-684, 1991.
  - 13. Fedida D, Braun AP and Giles WR.**  $\alpha_1$ -Adrenoceptors in myocardium: Functional aspects and transmembrane signaling mechanisms. *Physiological Review* 73: 469-487, 1993.
  - 14. Fiset C, Clark RB, Shimoni Y and Giles WR.** *Shal*-type channels contribute to the Ca<sup>2+</sup>-independent transient outward K<sup>+</sup> current in rat ventricle. *J Physiol* 500.1: 51-64, 1997.
  - 15. Gaughan JP, Hefner CA and Houser SR.** Electrophysiological properties of neonatal rat ventricular myocytes with alpha1-adrenergic-induced hypertrophy. *Am J Physiol* 275: H577-H590, 1998.
  - 16. Grandy SA, Trepanier-Boulay V and Fiset C.** Postnatal Development has a **Marked** Effect on Ventricular Repolarization in Mice. *Am J Physiol* 00521, 2007.



17. **Grupp IL, Lorenz JN, Walsh RA, Boivin GP and Rindt H.** Overexpression of  $\alpha 1B$ -adrenergic receptor induces left ventricular dysfunction in the absence of hypertrophy. *Am J Physiol* 275: H1338-H1350, 1998.
18. **Guo W, Jung WE, Marionneau C, Aimond F, Xu H, Yamada KA, Schwarz TL, Demolombe S and Nerbonne JM.** Targeted deletion of Kv4.2 eliminates  $I_{(to,f)}$  and results in electrical and molecular remodeling, with no evidence of ventricular hypertrophy or myocardial dysfunction. *Circ Res* 97: 1342-1350, 2005.
19. **Guo W, Kamiya K, Hojo M, Kodama I and Toyama J.** Regulation of Kv4.2 and Kv1.4  $K^+$  channel expression by myocardial hypertrophic factors in cultured newborn rat ventricular cells. *J Mol Cell Cardiol* 30: 1449-1455, 1998.
20. **Guo W, Kamiya K, Yasui K, Kodama I and Toyama J.** Paracrine hypertrophic factors from cardiac non-myocyte cells downregulate the transient outward current density and Kv4.2  $K^+$  channel expression in cultured rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 41: 157-165, 1999.
21. **Guo W, Xu H, London B and Nerbonne JM.** Molecular basis of transient outward  $K^+$  current diversity in mouse ventricular myocytes. *J Physiol* 521: 587-599, 1999.
22. **Hayabuchi Y, Standen NB and Davies NW.** Angiotensin II inhibits and alters kinetics of voltage-gated  $K(+)$  channels of rat arterial smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H2480-H2489, 2001.
23. **Isenberg G and Klockner U.** Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". *Pflug Arch* 395: 6-18, 1982.
24. **Kaab S, Nuss HB, Chiamvimonvat N, O'Rourke B, Pak PH, Kass DA, Marban E and Tomita F.** Ionic mechanisms of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res* 78: 262-273, 1996.

25. **Kassiri Z, Zobel C, Nguyen TT, Molkentin JD and Backx PH.** Reduction of I(to) causes hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res* 90: 578-585, 2002.
26. **Kuo HC, Cheng CF, Clark RB, Lin JJC, Lin JLC, Hoshijima M, Nguyen-Tran VTB, Gu Y, Ikeda Y, Chu PH, Ross JJr, Giles WR and Chien KR.** A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of I<sub>to</sub> and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* 107: 801-813, 2001.
27. **Lebeche D, Kaprielian R, del Monte F, Tomaselli G, Gwathmey JK, Schwartz A and Hajjar RJ.** In vivo cardiac gene transfer of Kv4.3 abrogates the hypertrophic response in rats after aortic stenosis. *Circulation* 110: 3435-3443, 2004.
28. **Lemire I, Ducharme A, Tardif JC, Poulin F, Jones LR, Allen BG and Rindt H.** Cardiac-directed overexpression of wild-type  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor induces dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol* 281: H931-H938, 2001.
29. **Lemire I, Allen BG, Rindt H and Hebert TE.** Cardiac-specific Overexpression of[alpha]1BAR Regulates[beta]AR Activity Via Molecular Crosstalk. *J Mol Cell Cardiol* 30: 1827-1839, 1998.
30. **Lizotte E, Tremblay A, Allen BG and Fiset C.** Isolation and characterization of subcellular protein fractions from mouse heart. *Analytical Biochemistry* 345: 47-54, 2005.
31. **London B, Guo W, Pan X, Lee JS, Shusterman V, Rocco CJ, Logothetis DA, Nerbonne JM and Hill JA.** Targeted replacement of Kv1.5 in the mouse leads to loss of the 4-aminopyridine-sensitive component of I<sub>K,slow</sub> and resistance to drug-induced QT prolongation. *Circ Res* 88: 940-946, 2001.
32. **Mitchell GF, Jeron A and Koren G.** Measurement of heart rate and QT interval in the conscious mouse. *Am J Physiol* 274: H747-H751, 1998.

33. **Po SS, Wu RC, Juang GJ, Kong W and Tomaselli GF.** Mechanism of alpha -adrenergic regulation of expressed hKv4.3 currents. *Am J Physiol* 281: H2518-H2527, 2001.
34. **Pourrier M, Schram G and Nattel S.** Properties, expression and potential roles of cardiac K<sup>+</sup> channel accessory subunits: MinK, MiRPs, KChIP, and KChAP. *J Membr Biol* 194: 141-152, 2003.
35. **Putzke C, Wemhoner K, Sachse FB, Rinne S, Schlichthorl G, Li XT, Jae L, Eckhardt I, Wischmeyer E, Wulf H, Preisig-Muller R, Daut J and Decher N.** The acid-sensitive potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle. *Cardiovasc Res* 75: 59-68, 2007.
36. **Ravens U, Wang XL and Wettwer E.** Alpha adrenoceptor stimulation reduces outward currents in rat ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 250: 364-370, 1989.
37. **Rivard K, Paradis P, Nemer M and Fiset C.** Cardiac-specific overexpression of the human type 1 angiotensin II receptor causes delayed repolarization. *Cardiovasc Res* 78: 53-62, 2008.
38. **Rorabaugh BR, Gaivin RJ, Papay RS, Shi T, Simpson PC and Perez DM.** Both alpha(1A)- and alpha(1B)-adrenergic receptors crosstalk to down regulate beta(1)-ARs in mouse heart: coupling to differential PTX-sensitive pathways. *J Mol Cell Cardiol* 39: 777-784, 2005.
39. **Rosen MR, Bilezikian JP, Cohen IS, Robinson RB and Steinberg SF.** Alpha-adrenergic modulation of cardiac rhythm. In: *Cardiac electrophysiology. From cell to bedside*, edited by Zipes DP and Jalife J. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1995, p. 435-440.

40. **Sanchez-Chapula J.** Multiple effects of putative alpha-adrenoceptor agonists on the electrical and mechanical activity of guinea-pig papillary muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 316: 108-111, 1981.
41. **Sanguinetti MC.** Reduced transient outward  $K^+$  current and cardiac hypertrophy: causal relationship or epiphenomenon? *Circ Res* 90: 497-499, 2002.
42. **Shibata R, Misonou H, Campomanes CR, Anderson AE, Schrader LA, Doliveira LC, Carroll KI, Sweatt JD, Rhodes KJ and Trimmer JS.** A Fundamental Role for KChIPs in Determining the Molecular Properties and Trafficking of Kv4.2 Potassium Channels. *J Biol Chem* 278: 36445-36454, 2003.
43. **Shimoni Y, Fiset C, Clark RB, Dixon JE, McKinnon D and Giles WR.** Thyroid hormone regulates postnatal expression of transient  $K^+$  channel isoforms in rat ventricle. *J Physiol* 500.1: 65-73, 1997.
44. **Swynghedauw B, Baillard C and Milliez P.** The long QT interval is not only inherited but is also linked to cardiac hypertrophy. *J Mol Med* 81: 336-345, 2003.
45. **Terzic A, Puceat M, Vassort G and Vogel SM.** Cardiac alpha 1-adrenoceptors: an overview. *Pharmacol Rev* 45: 147-175, 1993.
46. **Tomita F, Basset AL, Myerburg RJ and Kimura S.** Diminished transient outward currents in rat hypertrophied ventricular myocytes. *Circ Res* 75: 296-303, 1994.
47. **Trépanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A and Fiset C.** Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res* 89: 437-444, 2001.
48. **Vecchione C, Fratta L, Rizzoni D, Notte A, Poulet R, Porteri E, Frati G, Guelfi D, Trimarco V, Mulvany MJ, Agabiti-Rosei E, Trimarco B, Cotecchia S and Lembo**

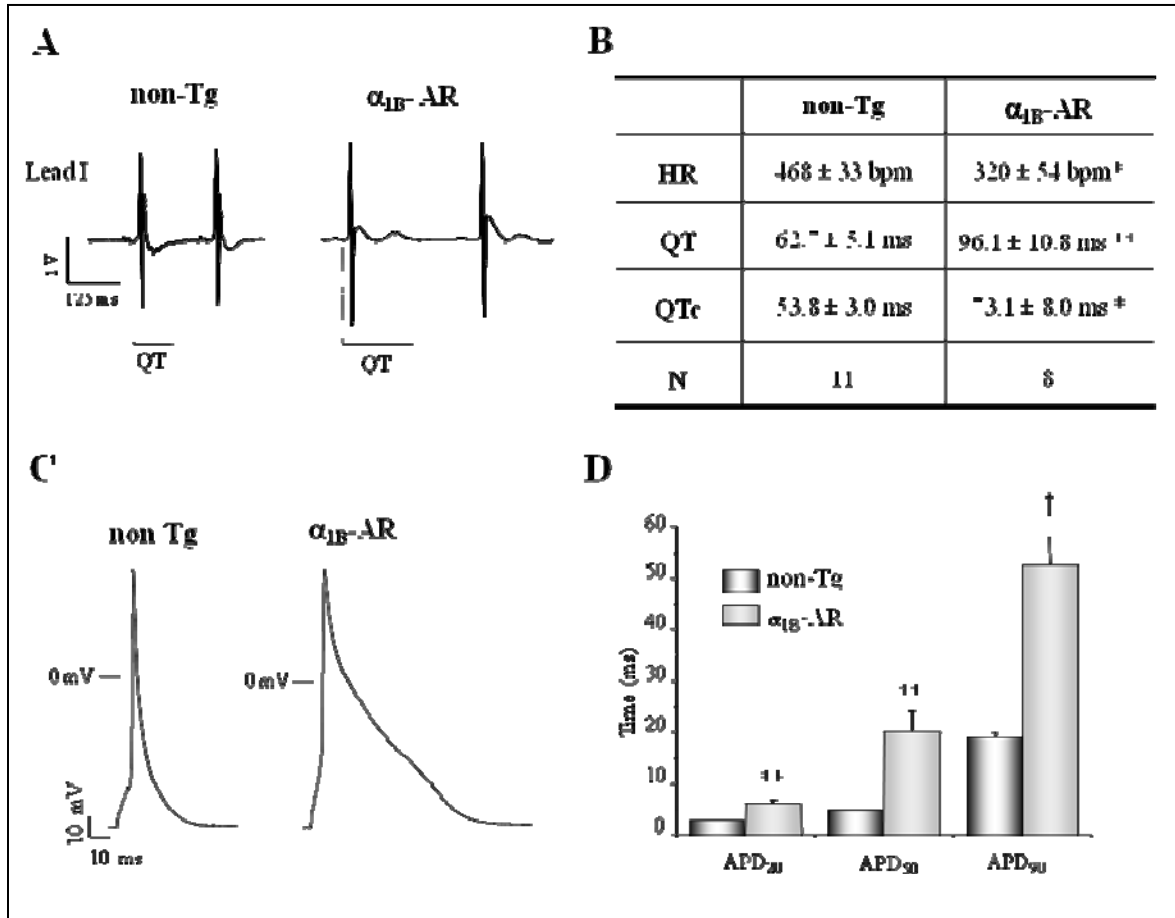
- G.** Cardiovascular Influences of  $\alpha_{1b}$ -Adrenergic Receptor Defect in Mice. *Circulation* 105: 1700-1707, 2002.
- 49. Wickenden AD, Lee P, Sah R, Huang Q, Fishman GI and Backx PH.** Targeted expression of a dominant-negative Kv4.2 K<sup>+</sup> channel subunit in the mouse heart. *Circ Res* 85: 1067-1076, 1999.
- 50. Xu H, Barry DM, Li H, Brunet S, Guo W and Nerbonne JM.** Attenuation of the slow component of delayed rectification, action potential prolongation, and triggered activity in mice expressing a dominant-negative Kv2 alpha subunit. *Circ Res* 85: 623-633, 1999.
- 51. Zaritsky JJ, Redell JB, Tempel BL and Schwarz TL.** The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K<sup>+</sup> current (I<sub>K1</sub>) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *J Physiol* 533: 697-710, 2001.
- 52. Zhang TT, Takimoto K, Stewart AFR, Zhu C and Levitan ES.** Independent Regulation of Cardiac Kv4.3 Potassium Channel Expression by Angiotensin II and Phenylephrine. *Circ Res* 88: 476-482, 2001.

### 3.2.7 Figures / Figures legend

**Figure 1. Electrophysiological differences between 9-12 mo non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice.**

**A-B. Comparison of QT interval between non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice.** **A.** Examples of lead I surface ECG obtained from non-Tg (left) and  $\alpha_{1B}$ -AR (right) mice. **B.** Table comparing mean heart rate (HR), QT and QTc intervals in both groups. «N» corresponds to the number of mice studied. (\*p<0.02, \*\*p<0.005). **C-D. APD prolongation in  $\alpha_{1B}$ -AR mouse ventricular myocytes.** **C.** Typical examples of action potential recorded in ventricular myocytes isolated from non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice at a rate frequency of 4 Hz.. For the examples shown in panel C, resting membrane potential were non-Tg: - 71.7 mV and  $\alpha_{1B}$ -AR: -70.0 mV. **D.** Bar graph showing the mean APD ( $\pm$  SEM) at 20%, 50%, and 90% of repolarization in non-Tg (n=19, N=3) and  $\alpha_{1B}$ -AR (n=22, N=3) mouse myocytes (\*\*p<0.005, †<0.00001). (n=number of cells; N=number of mice).

Figure 1. Electrophysiological differences between 9-12 mo non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice.

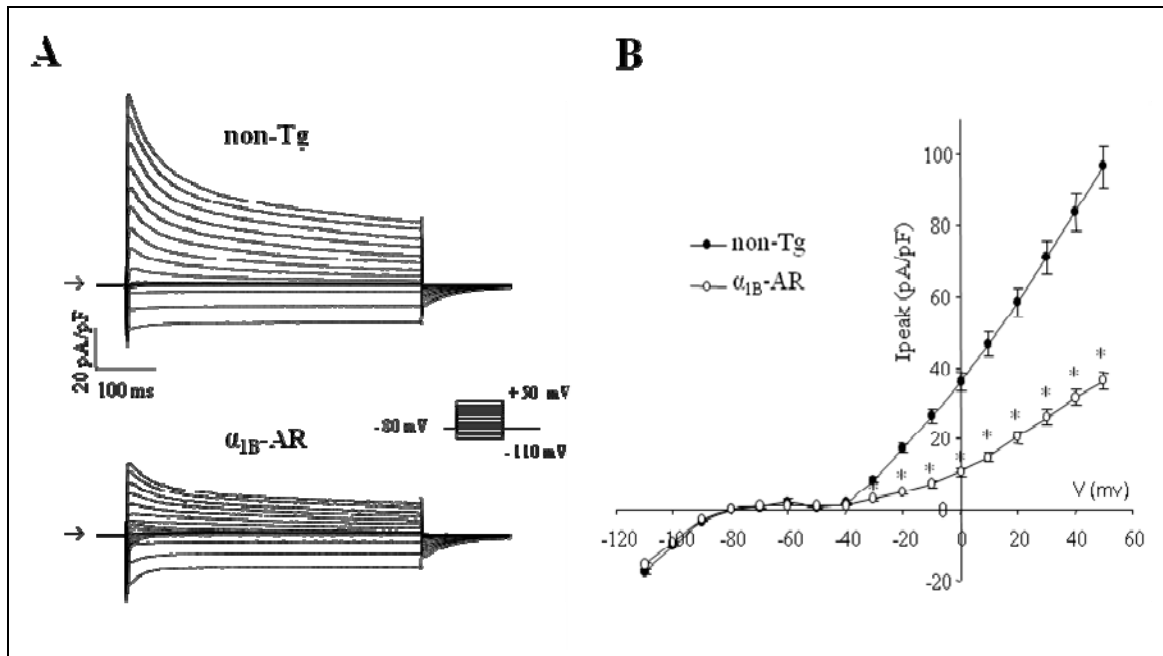


**Figure 2. Comparison of total  $K^+$  currents between 9-12 mo non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice.**

**A.** Typical example of family of  $K^+$  current obtained from ventricular myocytes isolated from non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice recorded using the voltage protocol shown in the inset at a rate frequency of at 0.1 Hz. **B.** The arrows indicate zero current on the recordings obtained on this figure and all subsequent figures. Mean I-V relationship for the peak  $K^+$  current ( $I_{peak}$ ) for the cells in the two groups shown in Panel A (non-Tg, n=14, N=3 ;  $\alpha_{1B}$ -AR, n=20, N=3, \*p<0.05).

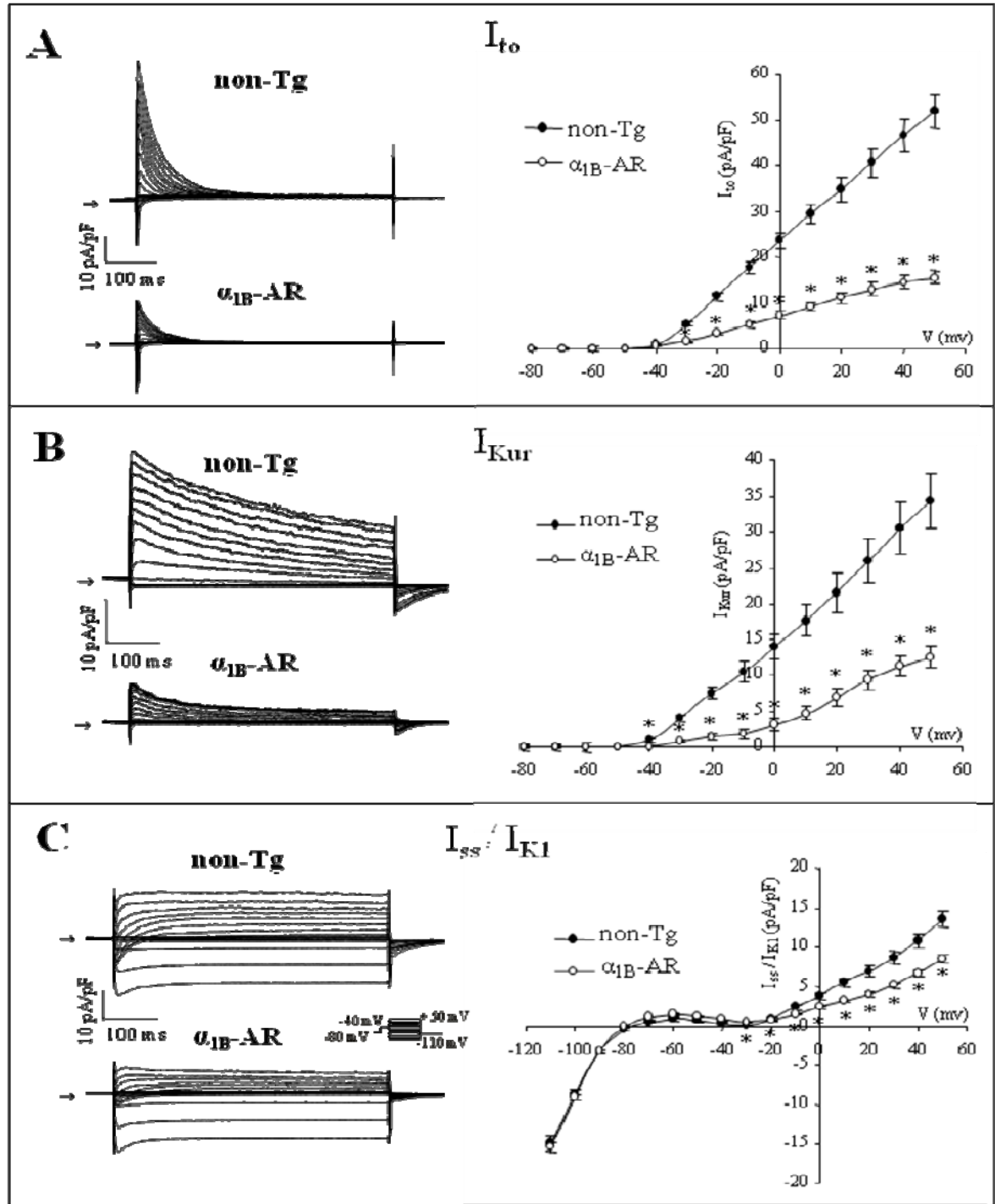


Figure 2. Comparison of total  $K^+$  currents between 9-12 mo non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice.



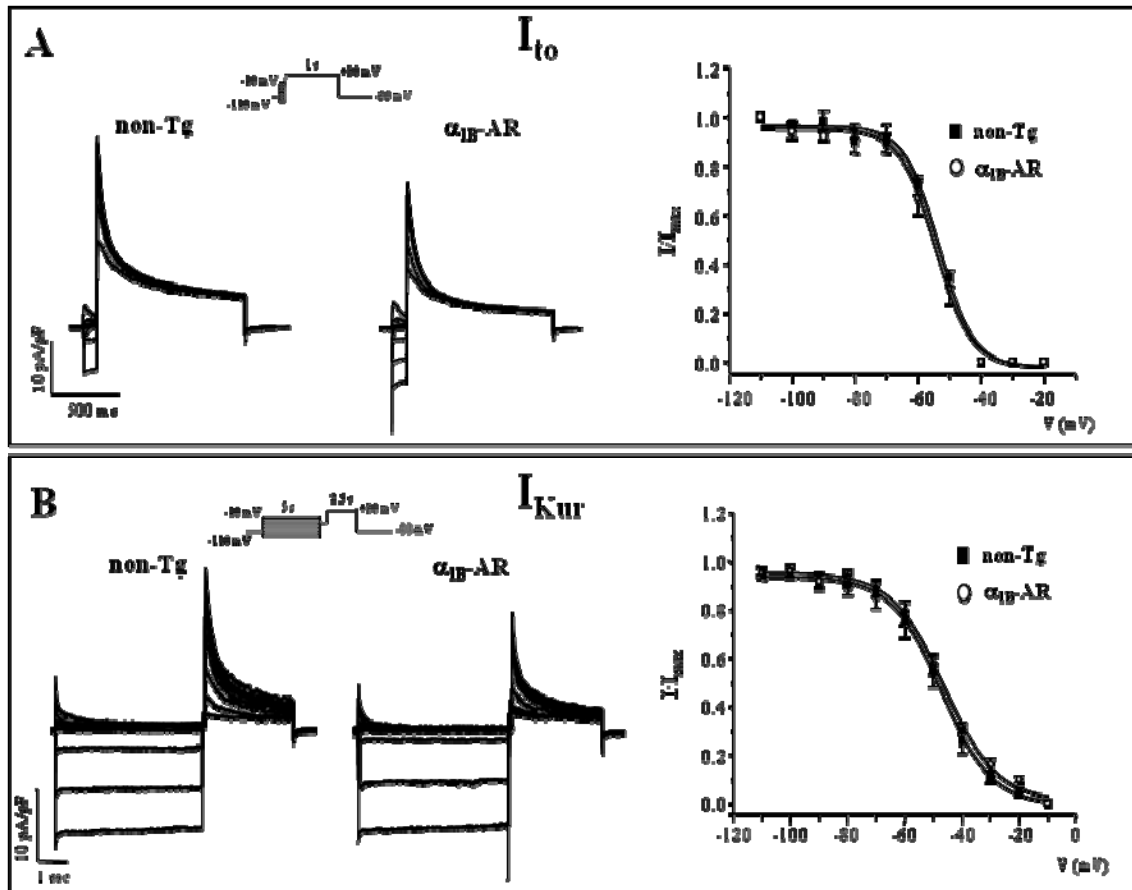
**Figure 3. Comparison of the individual  $K^+$  currents in ventricular myocytes isolated from 9-12 mo non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice.** **A.**  $I_{to}$  in non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR myocytes. *Left* - Superimposed current records corresponding to  $I_{to}$ . *Right* - Corresponding mean I-V relationships for  $I_{to}$  (non-Tg n=14; Tg n=19, \*p<0.05). **B.**  $I_{Kur}$  in non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR myocytes. *Left* - Family of membrane currents corresponding to  $I_{Kur}$  in non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR myocytes. *Right* - Corresponding mean I-V curves for  $I_{Kur}$  (non-Tg n=9; Tg n=14, \*p<0.05). **C.**  $I_{ss}$  and  $I_{K1}$  in non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR myocytes. *Left* - Representative examples of  $I_{ss}$  and  $I_{K1}$  in non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR myocytes. *Right* - Corresponding mean I-V curves for  $I_{ss}$  and  $I_{K1}$ . Current density of  $I_{K1}$ , which was activated by voltage steps ranging from -110 mV to -40 mV, was similar in non-Tg and Tg animals. However, outward  $K^+$  current ( $I_{ss}$ ) was significantly smaller in  $\alpha_{1B}$ -AR mouse myocytes (non-Tg n=9; Tg n=14, \*p<0.05) (for the description of the current separation, see Material and Methods).

Figure 3. Comparison of the individual  $K^+$  currents in ventricular myocytes isolated from 9-12 mo non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice.



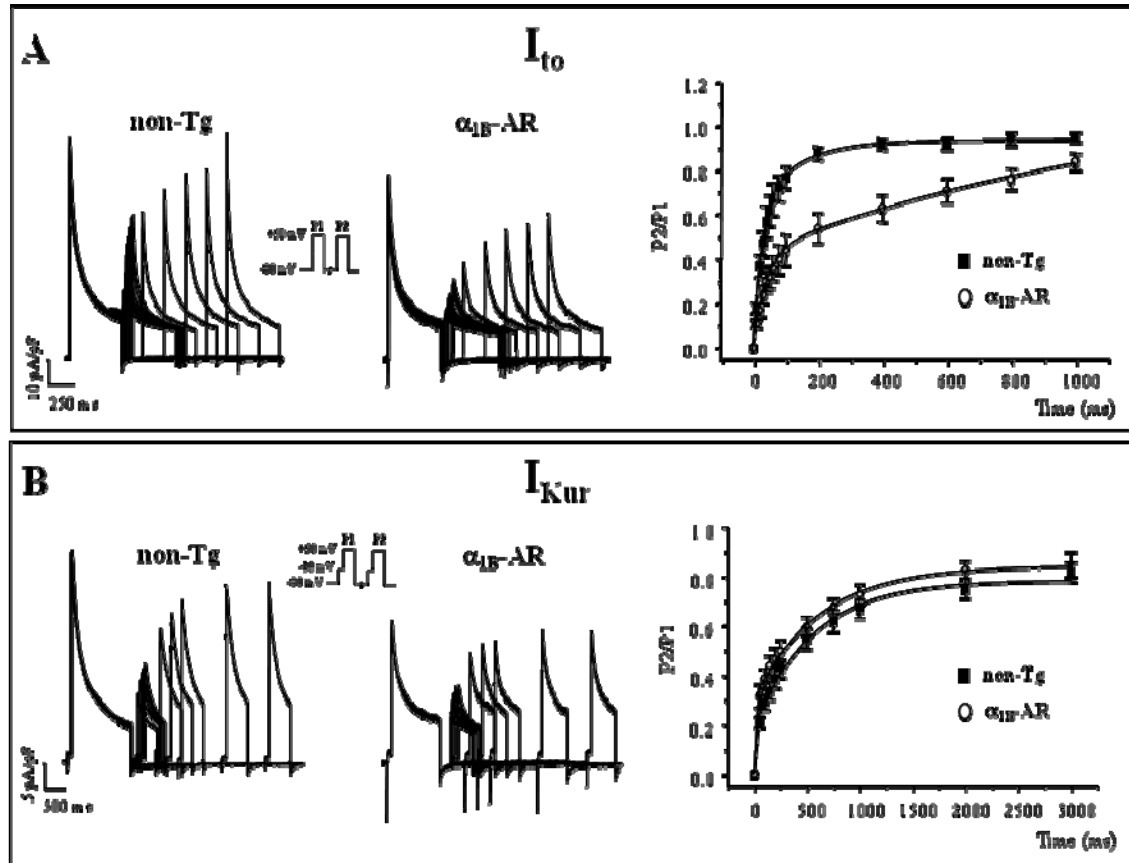
**Figure 4. Steady-state inactivation of  $I_{to}$  and  $I_{Kur}$  in 9-12 mo non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mouse ventricular myocytes.** **A. Voltage dependence of steady-state inactivation of  $I_{to}$ .** *Left* - Example of a family of currents produced by a two-pulse voltage-clamp protocol. The 100-ms inactivating prepulse potential was varied from -110 to -10 mV; the 1-sec test pulse potential was +30 mV (protocol shown in inset). *Right* - Plot of voltage dependence of steady-state inactivation of  $I_{to}$ . The amplitude of  $I_{to}$  for each prepulse membrane potential was determined by subtracting each test pulse current with that obtained with the -40 mV prepulse. The  $I_{to}$  test pulse amplitude was normalized to the amplitude at the most negative prepulse potential. Data were pooled from 10 non-Tg (N=3) and 9  $\alpha_{1B}$ -AR (N=3) cells. **B. Voltage dependence of steady-state inactivation of  $I_{Kur}$ .** *Left* - Example of a family of currents produced by a two-pulse voltage-clamp protocol showing the voltage dependence of the steady-state inactivation of  $I_{Kur}$ . Inactivating pulse (5-sec duration) was varied from -110 to -10 mV; the test pulse potential (2.5-sec duration) was +30 mV. *Right* - Plot of voltage dependence of steady-state inactivation of  $I_{Kur}$ . The  $I_{Kur}$  test pulse amplitude was normalized to the test amplitude for the most negative prepulse potential.  $I_{Kur}$  was obtained by subtraction of the current at the end of the test pulse from the peak test pulse current. Data were pooled from 10 non-Tg (N=3) and 8  $\alpha_{1B}$ -AR (N=3) cells. The smooth curves are the best-fit Boltzmann functions.

Figure 4. Steady-state inactivation of  $I_{to}$  and  $I_{Kur}$  in 9-12 mo non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mouse ventricular myocytes.



**Figure 5. Reactivation of  $I_{to}$  and  $I_{Kur}$  in 9-12 mo non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mouse ventricular myocytes.** **A. Recovery from inactivation of  $I_{to}$ .** *Left-* Example of a family of membrane currents produced by a two-pulse voltage-clamp protocol, showing the time-course of recovery of  $I_{to}$  from inactivation. A 500-ms inactivating pulse (+50 mV) was followed at intervals of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 200, 400, and 600 ms by an identical 500-ms test pulse. *Right -* Membrane potential dependence of recovery from inactivation of  $I_{to}$ . Data were pooled from 11 non-Tg (N=3) and 8  $\alpha_{1B}$ -AR (N=3) cells.  $P_2/P_1$  is the ratio of test pulse current/prepulse current amplitudes.  $I_{to}$  amplitude was measured as the difference between peak outward current and the current 150 ms after the peak. The holding and interpulse potentials were -80 mV. The smooth lines are best-fit single exponential functions. **B. Recovery from inactivation of  $I_{Kur}$ .** *Left-* Example of a family of membrane currents produced by a two-pulse voltage-clamp protocol, showing the time-course of recovery from inactivation of  $I_{Kur}$ . A 5 sec inactivating pulse was followed at intervals between 50 ms and 3 sec by a 2.5 sec test pulse. Both pulses were preceded by a brief (100 ms at -40 mV) pulse to inactivate  $I_{to}$ . The holding and interpulse potentials were -80 mV. *Right-* Membrane potential dependence of recovery from inactivation of  $I_{Kur}$ . Data were pooled from 11 non-Tg (N=3) and 8  $\alpha_{1B}$ -AR (N=3) cells.  $I_{Kur}$  amplitude was measured as the difference between peak test pulse current and the current at the end of the inactivating pulse. The smooth lines are best-fit single exponential functions.

Figure 5. Reactivation of  $I_{to}$  and  $I_{Kur}$  in 9-12 mo non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mouse ventricular myocytes.

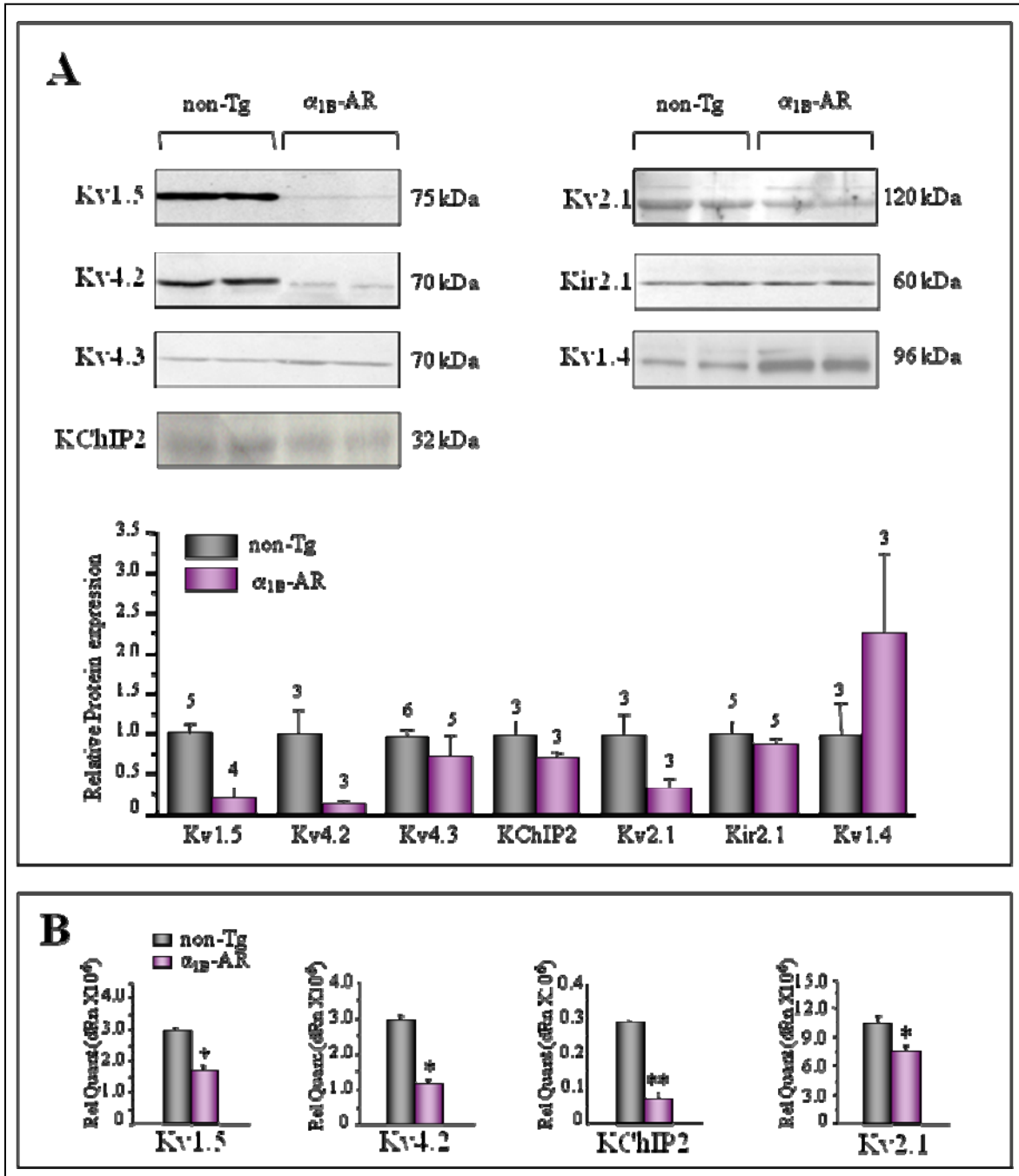


**Figure 6.  $K^+$  channels expression in 9-12 mo non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR ventricles.**

**A. Protein expression of  $K^+$  channels underlying  $K^+$  current present in mice ventricular myocytes.** Representative examples of Western blot analysis of Kv1.5 (1:500), Kv4.2 (1:1000), Kv4.3 (1:5000), Kv2.1 (1:500), Kir2.1 (1:500) and Kv1.4 (1:200) on sarcolemmal-enriched proteins and KChIP2 (1:200) on cytosolic proteins isolated (100  $\mu$ g/lane) from control and  $\alpha_{1B}$ -AR mice. Values in parentheses represent the dilution of the antibody. For each  $K^+$  channel, control and  $\alpha_{1B}$ -AR samples were run simultaneously on the same gel. Bar graphs (bottom) illustrating relative abundance of the different  $K^+$  channels protein expression determined by densitometry. All values were normalized to the Ponceau-S staining. Relative abundance was calculated with value for non-Tg mice as a reference of 100%. Non-Tg to  $\alpha_{1B}$ -AR ratio for each  $K^+$  channels is shown. Numbers on the top of each bar represents number of sample analyzed per group for each  $K^+$  channel. **B. mRNA expression levels of  $K^+$  channels in 9-12 mo non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR ventricles.** Bar graphs comparing the abundance of Kv1.5, Kv2.1, Kv4.2 and KChIP2 mRNA transcripts in non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice, determined by quantitative real-time RT-PCR. For each channel, control and  $\alpha_{1B}$ -AR cDNA samples were amplified simultaneously. Data represent mean values of 3 non-Tg and 4  $\alpha_{1B}$ -AR samples. Each sample was analyzed in triplicate (\*p=0.003, \*\*p=0.002).

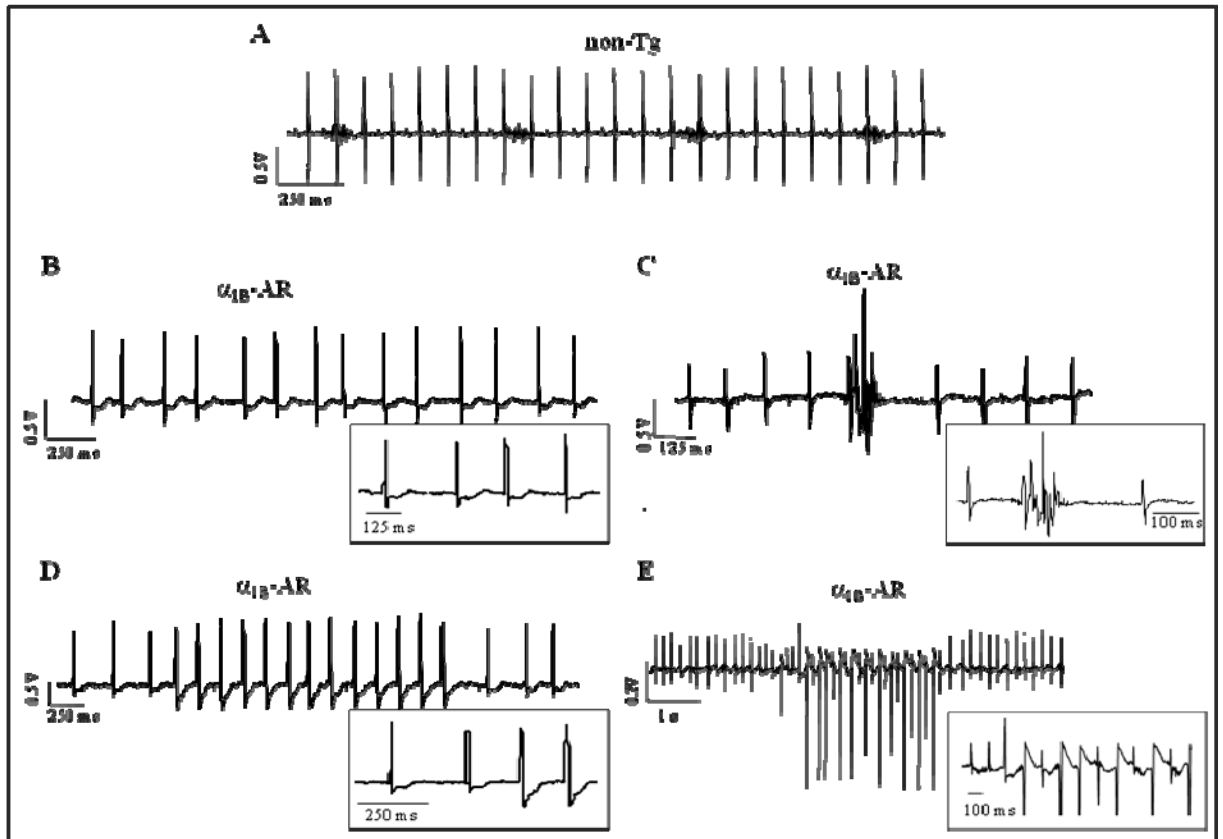


Figure 6. Figure 6.  $K^+$  channels expression in 9-12 mo non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR ventricles.



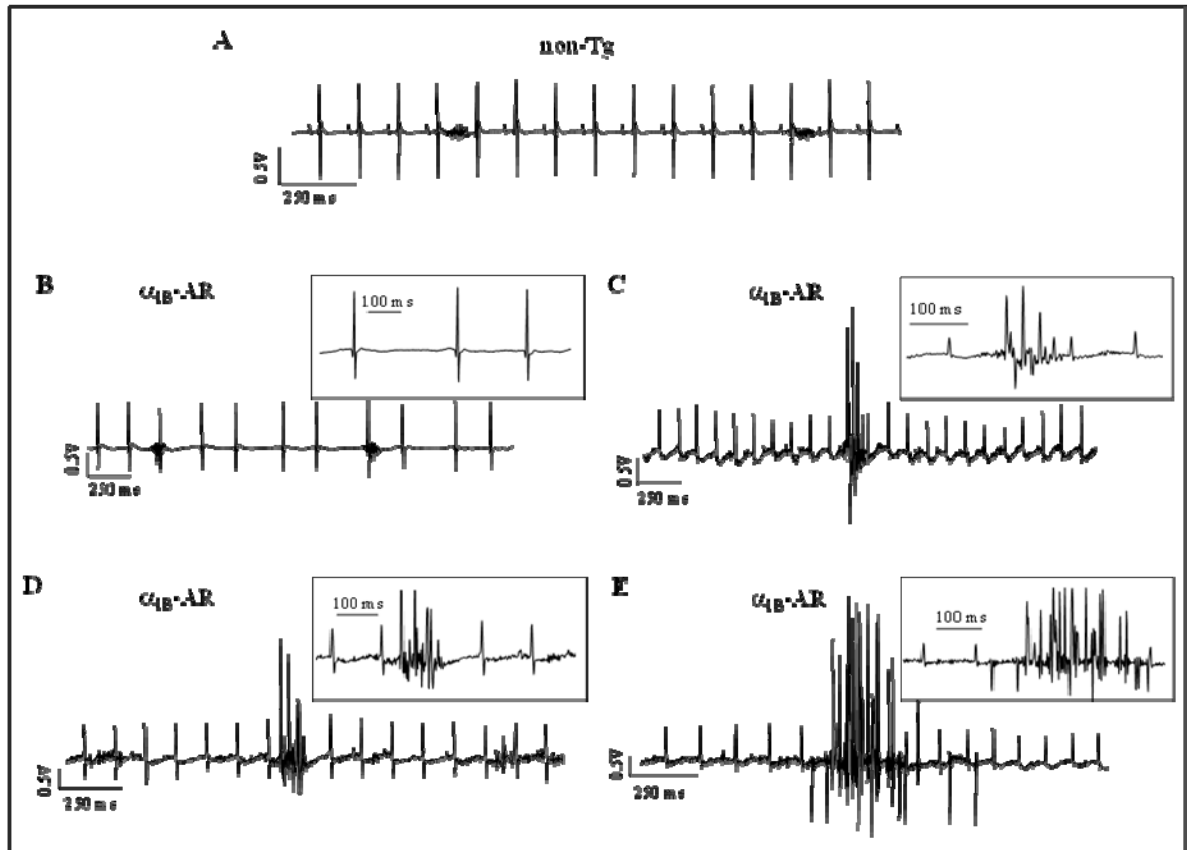
**Figure 7. Spontaneous arrhythmias in 9-12 mo  $\alpha_{1B}$ -AR mice.** **A.** Representative surface ECG recordings obtained in a non-Tg mouse showing a normal sinus rhythm. **B-E.** Examples of different types of arrhythmias observed in  $\alpha_{1B}$ -AR mice using surface ECG recordings or telemetry monitoring: (B) An irregular rhythm with normal QRS complex; (C) a premature ventricular complex, including premature beat followed by a pause. Note that the basal rhythm is delayed after the arrhythmia; (D) a non-sustained monomorphic ventricular tachycardia, with a sudden increase in ventricular rate and wider QRS complexes; and (E) a sustained polymorphic ventricular tachycardia. Recordings obtained in Panels B, C and D were obtained in anesthetized mice using surface ECG while data presented in Panel E was recorded with telemetry devices on freely moving mice. Note the different time scales between the panels.

Figure 7. Spontaneous arrhythmias in 9-12 mo  $\alpha_{1B}$ -AR mice.



**Figure 8. Spontaneous arrhythmias in 2-3 mo  $\alpha_{1B}$ -AR mice. (A-E)** Representative ECG recordings obtained in non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice. **(A) Surface ECG recording showing a normal sinus rhythm in a littermate control mouse. B-E.** Examples illustrate irregular rhythms observed in 2-3 mo  $\alpha_{1B}$ -AR mice: (B) An irregular rhythm with normal QRS complex obtained with surface ECG recordings; (C) a premature ventricular complex followed by a pause (surface ECG), (D) an example of premature ventricular complex recorded using telemetry; and (E) a nonsustained polymorphic ventricular tachycardia with a faster basal rhythm after the ventricular tachycardia recorded with telemetry device..

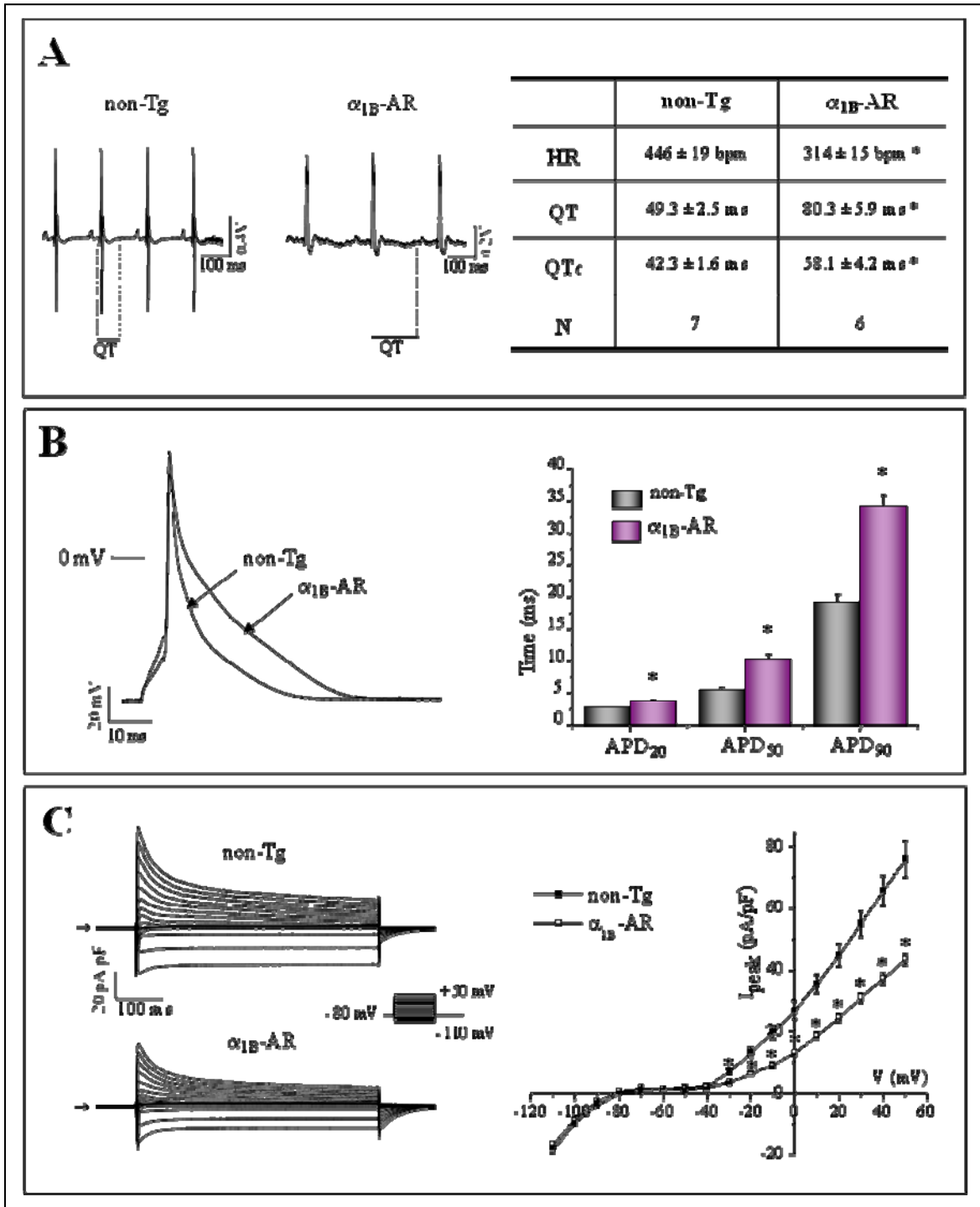
Figure 8. Spontaneous arrhythmias in 2-3 mo  $\alpha_{1B}$ -AR mice.



**Figure 9. Ventricular repolarization in 2-3 mo non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice.**

**A. Comparison of heart rate, QT and QTc intervals between 2-3 mo non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice.** Examples of lead I surface ECG obtained from 2-3 months non-Tg (*left*) and  $\alpha_{1B}$ -AR (*right*) mice are presented in the left panel. Right panel presents mean heart rate (HR), QT and QTc intervals in both groups. «N» refers to the number of mice studied. (\*p<0.05). **B. Comparison of the action potential duration (APD) between young non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice.** *Left* - Typical example of action potential recorded at 4 Hz are presented. For the examples shown in panel C, resting membrane potential were Control: -77.5 mV and  $\alpha_{1B}$ -AR: -78.5 mV. *Right* - Bar graph presenting mean APD ( $\pm$ SEM) at 20%, 50% and 90% of the repolarization in 22 non-Tg (N=3) and 21  $\alpha_{1B}$ -AR (N=3) ventricular myocytes (\*p<0.05). **C. Comparison of I<sub>peak</sub> in 2-3 mo non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice.** *Left* - Typical example of I<sub>peak</sub> recorded in non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR ventricular myocytes. *Right* - Mean I-V curve obtained from 10 non-Tg (N=2) and 20  $\alpha_{1B}$ -AR (N=3) cells (\*p< 0.05).

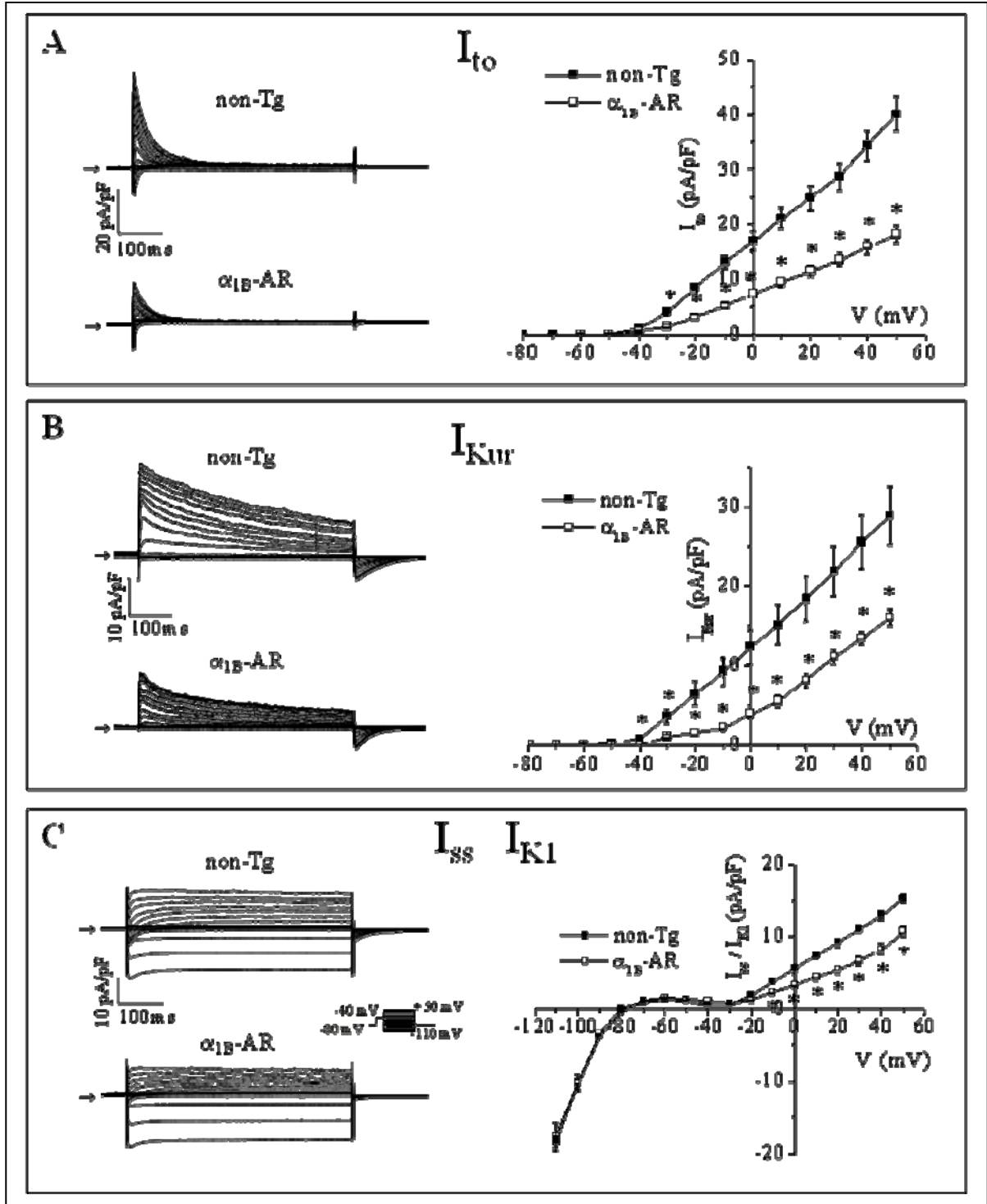
Figure 9. Ventricular repolarization in 2-3 mo non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice.



**Figure 10. Comparison of  $K^+$  currents in ventricular myocytes isolated from 2-3 mo non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice. A. The transient outward  $K^+$  current ( $I_{to}$ ). *Left* - Representative recordings of  $I_{to}$ . *Right* - Mean I-V curve showing that  $I_{to}$  was reduced in 2-3 mo  $\alpha_{1B}$ -AR ventricular myocytes (n=14, N=2) compared to non-Tg cells (n=10, N=3) (\*p<0.05). B. The ultra rapid delayed rectifier  $K^+$  current ( $I_{Kur}$ ). *Left* - Typical example of  $I_{Kur}$ . *Right* - Mean I-V relationships illustrating a significant decrease in  $I_{Kur}$  in 2-3 mo  $\alpha_{1B}$ -AR cells. (non-Tg, n=7, N=2;  $\alpha_{1B}$ -AR, n=10, N=3, \*p<0.05). C. The steady state outward  $K^+$  current ( $I_{ss}$ ) and the inward rectifier  $K^+$  current ( $I_{K1}$ ). *Left* - Representative examples of  $I_{ss}$  and  $I_{K1}$  from young non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR myocytes. *Right* - Corresponding mean I-V curves for  $I_{ss}$  and  $I_{K1}$  (non-Tg, n=7, N=2;  $\alpha_{1B}$ -AR, n=10, N=3; \*p<0.05).  $I_{ss}$  was significantly decreased in  $\alpha_{1B}$ -AR myocytes, whereas  $I_{K1}$  was similar in the two groups (p=NS). ) (for the description of the current separation, see Material and Methods).**

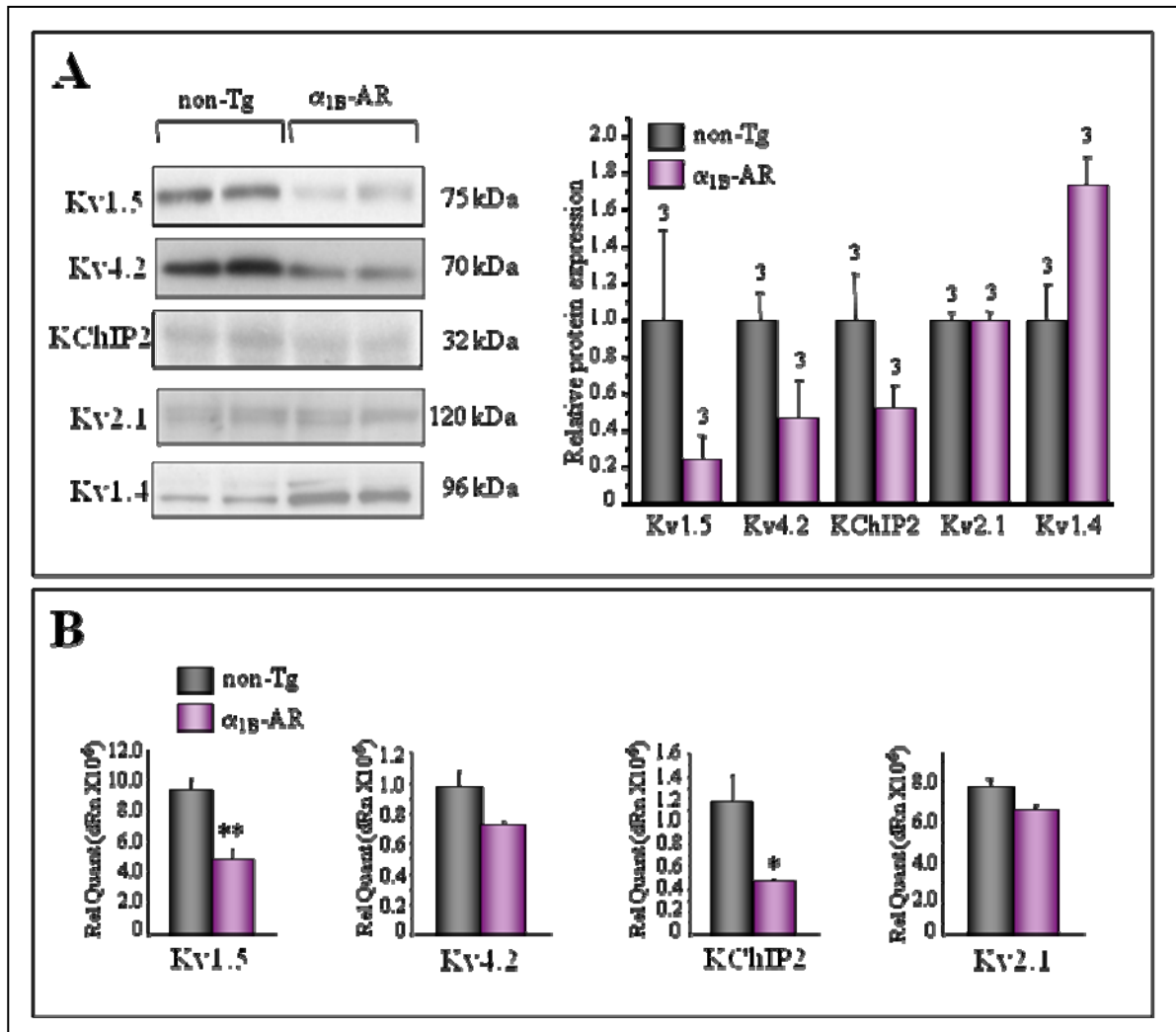


Figure 10. Comparison of  $K^+$  currents in ventricular myocytes isolated from 2-3 mo non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice.



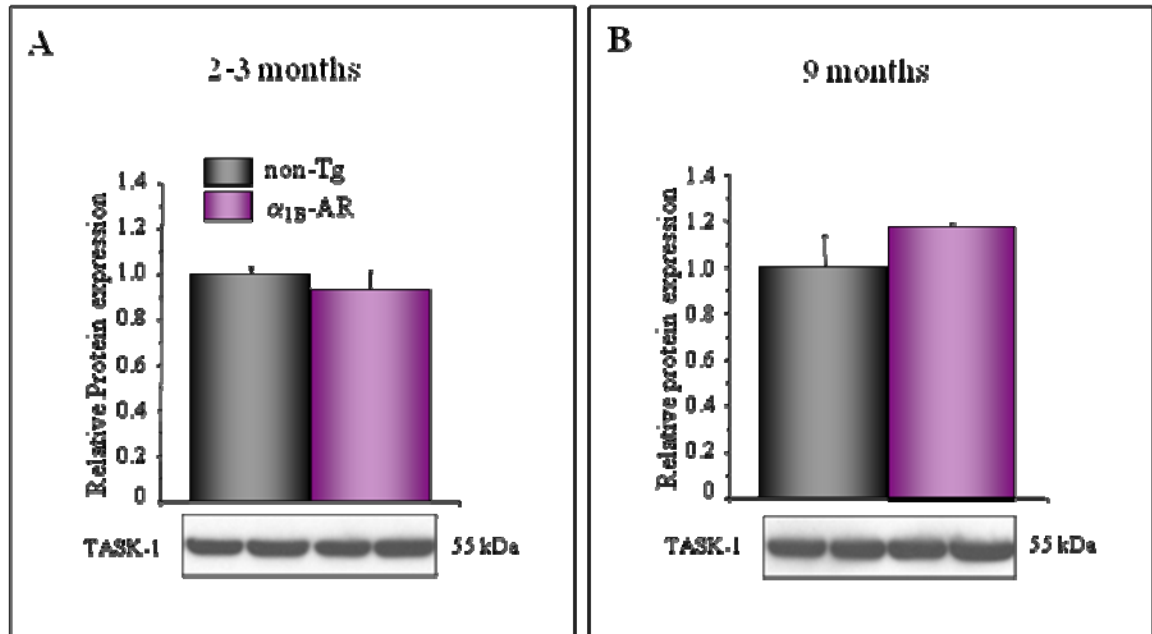
**Figure 11.  $K^+$  channels expression in 2-3 mo non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR ventricles. A. Protein expression of  $K^+$  channels underlying  $K^+$  current.** Representative examples of Western blot analysis of Kv1.5, Kv4.2, Kv4.3, KChIP2, Kv2.1 and Kv1.4 on sarcolemmal-enriched or cytosolic-enriched (KChIP2) proteins (100  $\mu$ g/lane,) isolated from non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR ventricles. Bar graphs illustrating relative abundance calculated with value for non-Tg mice as a reference of 100% for each  $K^+$  channels. Numbers of sample analyzed are shown on the top of each bar. **B.  $K^+$  channels mRNA expression in ventricular tissues isolated from 2-3 mo non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice.** Bar graphs comparing the abundance of Kv1.5, Kv4.2, KChIP2 and Kv2.1 mRNA transcripts between young non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice. For each channels, non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR cDNA samples were amplified simultaneously. Values were normalized to the cyclophilin signal. Each group of mice contains 3 samples and each sample was analyzed in triplicates (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01).

Figure 11.  $K^+$  channels expression in 2-3 mo non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR ventricles. A. Protein expression of  $K^+$  channels underlying  $K^+$  current.



**Figure 12. Protein expression of TASK-1 in non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice of both age groups.** Representative examples of Western blot analysis of TASK-1 on sarcolemmal-enriched proteins (100  $\mu$ g/lane,) isolated from non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR ventricles obtained from 2-3 mo and 9-12 mo mice. Bar graph data represent mean values of 3 non-Tg and 3  $\alpha_{1B}$ -AR samples for both age groups.

**Figure 12.** Protein expression of TASK-1 in non-Tg and  $\alpha_{1B}$ -AR mice of both age groups.



## Chapitre 4

### Discussion

#### 4.1 Résumé des principaux résultats

##### 4.1.1 Mise en contexte

Les cardiomyopathies sont des pathologies du muscle cardiaque qui affectent la structure et la fonction du cœur. Au cours de ces pathologies, des mécanismes compensatoires, tels que l'activation du système rénine angiotensine-aldostérone (SRAA) et l'activation du système nerveux sympathique (SNS) sont recrutés afin de préserver la fonction du cœur. Toutefois, la stimulation excessive ou à long terme de ces systèmes est aussi associée avec une transformation du phénotype cardiaque et progresse vers la décompensation de la fonction cardiaque et l'insuffisance cardiaques. Le remodelage et l'insuffisance cardiaque sont généralement associés avec d'autres troubles cardiaques tels qu'une incidence accrue d'arythmies graves qui augmentent les risques de mortalité. Le SRAA et le SNS agissent au niveau systémique, entre autres, par la régulation de la pression sanguine et peuvent ainsi avoir indirectement un effet sur le cœur. Ils ont aussi un effet direct au niveau cardiaque puisque l'Ang II et la norépinéphrine peuvent y lier les récepteurs de type 1 de l'Ang II (AT1) et les récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques. Deux modèles de souris transgéniques surexprimant le récepteur AT1 (la souris AT1R) ou le récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénergique ( $\alpha_{1B}$ -AR) spécifiquement au niveau cardiaque ont été créés afin d'étudier les effets de l'activation excessive de ces récepteurs sur le cœur. Les deux modèles de souris présentent un phénotype pathologique cardiaque différent (cardiomyopathie hypertrophique chez les souris AT1R ou dilatée chez les souris  $\alpha_{1B}$ -AR) et développent à long terme de l'insuffisance cardiaque et décèdent prématurément. En plus d'être associée avec l'hypertrophie et le remodelage cardiaques, des données de la littérature ont suggéré que

l'activation du récepteur AT1 et du récepteur  $\alpha_1$ -AR pourrait aussi être directement impliquée dans la régulation des courants ioniques et l'apparition d'arythmies cardiaques. Ainsi, nous avons étudié la repolarisation ventriculaire des souris transgéniques AT1R et  $\alpha_{1B}$ -AR afin de vérifier si la surexpression de ces deux récepteurs spécifiquement au niveau cardiaque pouvait affecter la repolarisation pour produire des arythmies et ainsi jouer un rôle dans la mort prématurée de ces souris.

#### **4.1.2 Caractérisation de la repolarisation ventriculaire des souris AT1R**

L'objectif du premier projet de recherche était de caractériser la repolarisation des souris AT1R mâles à deux âges différents, soit 50 jours et 6 mois. À 6 mois, le phénotype pathologique cardiaque est bien établi, c'est-à-dire que les souris présentent de l'hypertrophie au niveau cellulaire et tissulaire. À cet âge, les souris AT1R ont aussi une diminution de la fonction cardiaque et plusieurs décèdent spontanément. À 50 jours, les souris AT1R ont atteint leur maturité sexuelle mais ne présentent pas d'hypertrophie, tant au niveau cellulaire qu'au niveau tissulaire. L'utilisation de ces deux groupes d'âge permet de dissocier les effets directement produits par l'activation excessive du récepteur de l'Ang II des effets qui pourraient être associés avec l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque. Les résultats nous ont montré que les souris AT1R de 6 mois avaient une diminution de la densité des courants  $K^+$  ;  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$  et  $I_{K1}$ . La diminution de  $I_{to}$  était expliquée en partie par un recouvrement plus lent de l'inactivation du courant alors que l'inactivation à l'équilibre n'était pas différente. Ces deux paramètres de cinétique d'inactivation des courants n'étaient pas affectés pour  $I_{Kur}$ . L'expression des canaux  $K^+$ , Kv4.2, Kv1.5 et Kir2.1 (correspondants aux courants  $K^+$   $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$  et  $I_{K1}$  diminués) ainsi que de KChIP2 était diminuée et pourrait expliquer la réduction de la densité des courants  $K^+$  correspondants. De plus, cette diminution des courants  $K^+$  entraînait une prolongation de la durée du potentiel d'action des cardiomyocytes ventriculaires qui se reflétait sur l'ECG par une prolongation de l'intervalle QTc. Des enregistrements d'ECG en télémétrie chez les souris AT1R nous ont révélé que ces souris transgéniques avaient des arythmies ventriculaires

spontanées qui pourraient être expliquées par les troubles de repolarisation. Ces résultats ont aussi été observés chez les souris AT1R de 50 jours, ce qui montrait que l'activation accrue et chronique de la voie de signalisation du récepteur de l'Ang II au niveau cardiaque serait directement responsable du remodelage électrique et du retard de repolarisation et pourraient causer des arythmies. La principale différence entre les animaux présentant ou non des signes d'hypertrophie était la diminution du courant  $I_{K1}$  chez les AT1R de 6 mois qui n'était pas présente chez les animaux plus jeunes. Ce résultat suggère que le courant  $I_{K1}$  ne serait pas directement régulé par l'activation du récepteur AT1, puisqu'il était affecté plus tardivement au cours du développement de l'hypertrophie ou au cours de la progression de la maladie vers la décompensation cardiaque.

#### **4.1.3 Caractérisation de la repolarisation ventriculaire des souris $\alpha_{1B}$ -AR**

Le second projet portait sur la caractérisation de la repolarisation ventriculaire chez les souris  $\alpha_{1B}$ -AR. Comme pour les souris AT1R, deux groupes d'âge ont été utilisés, soient des souris de 2-3 mois et des souris de 9 mois. Le phénotype pathologique se développe plus tardivement chez les souris  $\alpha_{1B}$ -AR que chez les souris AT1R. Les souris  $\alpha_{1B}$ -AR des deux groupes d'âge ont montré une prolongation de l'intervalle QTc associée avec une prolongation de la durée du potentiel d'action et à une diminution significative de la densité des courants  $K^+$ ,  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$  et  $I_{ss}$ , sans changement de densité du courant  $I_{K1}$ . Comme pour les souris AT1R,  $I_{to}$  était régulé au niveau de sa cinétique par un recouvrement plus lent de l'inactivation, sans différence pour l'inactivation à l'équilibre alors que les propriétés d'inactivation de  $I_{Kur}$  chez les souris  $\alpha_{1B}$ -AR n'étaient pas différentes. De plus, l'expression protéique des canaux Kv4.2, Kv1.5 et Kv2.1 était diminuée chez les transgéniques. Les niveaux d'expression de l'ARNm étaient aussi diminués pour Kv4.2, Kv1.5, Kv2.1 et KChIP2, ce qui confirme que la régulation de l'expression de ces canaux se fait au niveau transcriptionnel. Récemment, des études ont suggéré qu'un canal à deux pores transmembranaires sensible au pH, le canal TASK, serait présent au niveau cardiaque et pourrait jouer un rôle au cours du potentiel d'action. Une étude a de plus suggéré que le



canal TASK serait inhibé par la stimulation du récepteur  $\alpha_{1A}$ -adrénergique.<sup>202,203</sup> Nous avons donc vérifié l'expression protéique de ce canal chez les souris  $\alpha_{1B}$ -AR afin de voir si TASK pouvait aussi être régulé par la stimulation de la voie d'activation du récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénergique et nous avons observé que le niveau d'expression protéique de TASK n'était pas modifié. Finalement, les souris  $\alpha_{1B}$ -AR de 2-3 mois et de 9 mois avaient des arythmies spontanées qui pourraient être expliquées par les troubles de repolarisation. Ainsi, comme pour les souris AT1R, la stimulation excessive du récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénergique au niveau cardiaque serait responsable des troubles de repolarisation et pourrait mener à des arythmies.

## **4.2 Comparaison des deux modèles de cardiomyopathie**

### **4.2.1 Comparaison des phénotypes pathologiques**

Les souris AT1R et  $\alpha_{1B}$ -AR sont deux modèles différents de cardiomyopathies. La stimulation excessive de la voie du récepteur AT1 chez les souris AT1R produit une augmentation de la masse du ventricule, une augmentation de la capacitance (indice de la grosseur des cardiomyocytes) et une diminution de la contraction cardiaque observée par une diminution de la fraction de raccourcissement du ventricule gauche calculée à partir des dimensions internes du ventricule gauche à la fin de la systole et de la diastole (voir Chapitre 2). Ces données confirment la présence d'hypertrophie et la diminution de la fonction cardiaque chez les souris AT1R de 6 mois. D'un autre côté, le phénotype pathologique cardiaque des souris  $\alpha_{1B}$ -AR est caractérisé par une dilatation des chambres cardiaques et une diminution de la fonction systolique ventriculaire sans développer de phase d'hypertrophie.<sup>179</sup> Nous avons pu confirmer qu'il n'y avait pas d'hypertrophie au niveau cellulaire chez les souris  $\alpha_{1B}$ -AR par les valeurs des capacitances qui étaient comparables entre les souris transgéniques et les souris de type sauvage à 2-3 mois et à 9 mois (Chapitre 3). Les deux formes de cardiomyopathie représentées par ces deux modèles de souris sont causées par la stimulation de deux récepteurs associés avec des cascades de

signalisation différentes et produisent toutes les deux une perte de la fonction cardiaque. Les souris AT1R et  $\alpha_{1B}$ -AR présentent aussi toutes les deux un retard de repolarisation important associé avec des arythmies spontanées. La stimulation des voies de signalisation des récepteurs AT1 et  $\alpha_{1B}$ -adrénergiques affecte de façon importante les courants  $K^+$  responsables de la repolarisation.

#### **4.2.2 Comparaison de la régulation des courants $K^+$ entre les souris AT1R et $\alpha_{1B}$ -AR**

L'activation accrue et persistente des différentes voies de signalisation associées à chacun des récepteurs surexprimés dans les deux modèles de souris transgéniques produit une diminution des courants  $K^+$   $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$  et  $I_{ss}$ . Cette diminution est présente chez les animaux avec et sans hypertrophie, ce qui signifie que l'activation des deux récepteurs affecte directement ces trois courants  $K^+$ . De plus, il semble que la régulation des différents courants  $K^+$  par l'activation des deux récepteurs se fasse de façon semblable.

##### **4.2.2.1 Régulation du courant $K^+$ transitoire sortant indépendant du $Ca^{2+}$ , $I_{to}$**

Dans les deux modèles de souris transgéniques, la régulation de  $I_{to}$  se produit par un recouvrement de l'inactivation plus lent et par une diminution de l'expression du canal Kv4.2 (au niveau de l'ARNm et des protéines). De plus, l'expression de l'ARNm de la protéine accessoire pour le courant  $I_{to}$ , KChiP2, est diminuée chez les AT1R et les  $\alpha_{1B}$ -AR. KChiP2 régule les niveaux d'expression du canal à la membrane ainsi que les cinétiques d'activation et d'inactivation du courant. La coexpression de KChiP2 avec les protéines des canaux Kv4.X augmente l'expression du canal à la membrane cellulaire, ralentit l'inactivation et accélère le recouvrement de l'inactivation.<sup>1</sup> Sans KChiP2, le canal est ainsi moins exprimé et moins souvent actif. La diminution de l'expression de KChiP2 dans les deux modèles transgéniques pourrait être en partie responsable de la diminution de  $I_{to}$  puisque dans les deux cas, l'expression de Kv4.2 à la membrane est plus petite et le

recouvrement de l'inactivation de  $I_{to}$  est plus lent chez les souris transgéniques. L'ensemble de ces résultats suggère que la régulation de  $I_{to}$  par la suractivation des voies des récepteurs AT1 et  $\alpha_{1B}$ -adrénergiques implique des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels (transport des protéines à la membrane et régulation de la cinétique). Chez la souris,  $I_{to}$  est produit par deux canaux soient Kv4.2 et Kv4.3. Nos résultats confirment que la diminution de l'expression d'un seul des deux canaux, ici Kv4.2, est suffisante pour diminuer la densité de  $I_{to}$ .

#### 4.2.2.2 Régulation du courant $K^+$ à rectification retardée ultrarapide, $I_{Kur}$

La diminution de la densité de  $I_{Kur}$  chez les AT1R et les  $\alpha_{1B}$ -AR est causée par une diminution de l'expression du canal Kv1.5. Dans les deux cas, le recouvrement de l'inactivation et l'inactivation à l'équilibre ne sont pas affectés par l'activation chronique des voies des récepteurs alors que l'expression protéique et/ou de l'ARNm du canal est diminuée chez les transgéniques. Chez les souris  $\alpha_{1B}$ -AR, l'expression de l'ARNm et des protéines de Kv1.5 est diminuée, suggérant une régulation au niveau transcriptionnel. D'un autre côté, l'analyse de l'expression de Kv1.5 chez les souris AT1R, suggère une régulation au niveau post-transcriptionnel (diminution des protéines sans réduction de l'ARNm). Une étude a montré précédemment que KChIP2 peut interagir avec Kv1.5.<sup>204</sup> Contrairement aux effets sur les canaux Kv4.x, l'interaction de KChIP2 avec Kv1.5 résulte en une diminution de l'expression du canal à la membrane cellulaire et n'a pas d'effet sur les propriétés de dépendance au voltage ou au temps du courant  $I_{Kur}$ . Ainsi, la diminution de l'expression de KChIP2 pourrait produire une augmentation de l'expression de Kv1.5 dans nos deux modèles de souris transgéniques. Toutefois, les observations faites sur l'expression et les cinétiques d'activation de  $I_{Kur}$  sont contraires à l'effet attendu par rapport à cette étude, ce qui suggère que des changements dans l'interaction entre KChIP2 et Kv1.5 ne feraient pas partie des mécanismes de régulation impliqués dans la diminution de  $I_{Kur}$  chez les souris AT1R et  $\alpha_{1B}$ -AR. D'autres mécanismes post-transcriptionnels sembleraient être en cause concernant la régulation de  $I_{Kur}$  chez les souris AT1R.

#### 4.2.2.3 Régulation du courant $I_{ss}$

L'analyse des résultats concernant le mode de régulation du courant  $I_{ss}$  est un peu plus complexe que celle pour  $I_{to}$  et  $I_{Kur}$ . L'expression du canal Kv2.1, correspondant à  $I_{ss}$ , n'est pas toujours régulée dans le même sens que la régulation du courant. Chez les souris AT1R,  $I_{ss}$  est diminué chez les souris transgéniques de 50 jours, mais n'est plus significativement différent chez les souris de 6 mois. L'analyse des niveaux d'expression réalisée seulement chez les animaux de 6 mois, a révélé que les niveaux d'ARNm de Kv2.1 sont inchangés alors que l'expression protéique est augmentée chez les AT1R. Ces résultats suggèrent que l'expression de Kv2.1 pourrait être augmentée par un mécanisme post-transcriptionnel pour tenter de compenser la diminution du courant  $I_{ss}$  ou la diminution générale des courants  $K^+$  chez les AT1R. D'autres études ont aussi montré que l'expression de ce canal pourrait être augmentée lorsque d'autres courants  $K^+$  sont affectés, entre autres, lorsque le courant  $I_{Kur}$  est diminuée.<sup>205,206</sup> Cette hypothèse pourrait expliquer que la différence de densité de  $I_{ss}$  entre les contrôles et les transgéniques ne soit plus significative chez les AT1R de 6 mois. Chez les souris  $\alpha_{1B}$ -AR,  $I_{ss}$  est diminué significativement chez les jeunes et les vieilles souris transgéniques et l'expression de Kv2.1 tend à diminuer (non significativement) et non à augmenter. Le mécanisme compensatoire observé chez les AT1R ne semble pas être présent chez les  $\alpha_{1B}$ -AR. Il est possible que la signalisation associée avec le récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénergique empêche ou ne permet pas ce mécanisme de compensation.

#### 4.2.2.4 Régulation du courant $I_{K1}$

Le courant à rectification entrante  $I_{K1}$  n'est pas régulé dans les deux groupes de souris  $\alpha_{1B}$ -AR. Ce courant n'est pas non plus affecté directement par la stimulation du récepteur AT1 puisqu'il n'y a pas de différence entre les souris AT1R et contrôles de 50 jours. Toutefois, chez les souris AT1R de 6 mois,  $I_{K1}$  est diminué. Ces résultats suggèrent que le courant  $I_{K1}$  n'est pas touché directement par l'activation des deux récepteurs

impliqués dans le développement de la cardiomyopathie. Toutefois,  $I_{K1}$  serait affecté par la signalisation associée avec le remodelage et plus particulièrement avec l'hypertrophie puisque cette diminution est seulement présente en conditions hypertrophiques. Une étude publiée en 2008 avait montré que l'activation de la PKC diminuait le courant  $I_{K1}$  seulement par des effets sur les canaux Kir2.2 et Kir2.3, sans modifier le canal Kir2.1.<sup>207</sup> Nos résultats vont dans le même sens que cette étude puisque l'activation excessive des voies des récepteurs AT1 et  $\alpha_{1B}$ -adrénergiques (qui activent tous deux la PKC) n'a pas d'effet direct sur le courant  $I_{K1}$ . La diminution de  $I_{K1}$  est observée seulement chez les souris AT1R ayant de l'hypertrophie, ce qui suggère que la diminution du courant  $K^+$  entrant  $I_{K1}$  est associée avec des mécanismes de régulation reliés spécifiquement au développement du phénotype d'hypertrophie, donc à des voies de signalisation indépendantes des protéines Gq, activées chez les deux modèles transgéniques.

### 4.2.3 Conséquences des troubles de repolarisation

Nous avons vu que l'activation excessive des voies des récepteurs AT1 et  $\alpha_{1B}$ -adrénergiques affecte directement les courants  $K^+$  et la repolarisation ventriculaire. Dans les deux modèles de souris transgéniques, les troubles de repolarisation apparaissent avant le développement de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque et pourraient être responsables du développement d'arythmies et mener à la mort prématurée de ces animaux. La diminution de la densité des courants  $K^+$  pourrait également faire partie des mécanismes impliqués dans le développement du remodelage puisque la prolongation de la durée du potentiel d'action, principalement au début du potentiel d'action avec la diminution de  $I_{to}$ , modifie la fenêtre d'activation des autres courants ioniques. Un de ces courants est le courant  $Ca^{2+}$  de type L présent au cours de la phase 2 du potentiel d'action. La prolongation de la fenêtre d'activation du courant  $Ca^{2+}$  est associée avec des troubles du rythme (sur des EAD) et à l'apparition d'arythmies. Cette possible augmentation de  $I_{CaL}$  pourrait aussi produire une plus grande entrée de  $Ca^{2+}$  et perturber les mécanismes de régulation de l'homéostasie du  $Ca^{2+}$  intracellulaire. La régulation de l'homéostasie du  $Ca^{2+}$  est importante

pour plusieurs phénomènes cardiaques tels que (1) la régulation de l'excitabilité des cardiomyocytes, (2) la régulation de la contraction cardiaque et (3) la régulation de l'activité de protéines dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  qui peuvent être associées avec l'hypertrophie et le remodelage cardiaque (Section 1.2). Des perturbations de l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  sont aussi associées avec des troubles rythmiques comme les DADs.

Malgré que les deux modèles de souris transgéniques représentent deux modèles de cardiomyopathies différents, soit un modèle de cardiomyopathie hypertrophique pour la souris AT1R et un modèle de cardiomyopathie dilatée pour la souris  $\alpha_{1B}$ -AR, les troubles de repolarisation qui se produisent dans ces deux modèles sont très semblables. Ces troubles sont impliqués dans le développement d'arythmies et possiblement dans la diminution de la contraction cardiaque que l'on retrouve dans les deux modèles. Toutefois, compte tenu que les phénotypes pathologiques cardiaques sont différents (hypertrophique ou dilatée), il est peu probable que les changements observés dans la repolarisation soient des déterminants majeurs dans le développement spécifique de chacun des phénotypes. L'activation des récepteurs de type 1 de l'Ang II et des récepteurs  $\alpha_{1B}$ -adrénergiques entraînent l'activation de certaines cascades de signalisation intracellulaire similaires, comme l'activation des protéines  $\text{G}\alpha_q$  et  $\text{G}\alpha_i$ . Ainsi, puisque la régulation des courants  $\text{K}^+$  est semblable dans les deux modèles de souris transgéniques, il est possible que ce soit l'activation d'une des cascades de signalisation intracellulaire activée par les deux récepteurs qui soit responsable des effets sur la repolarisation. Quelques études avaient d'ailleurs montré que l'activation des PKC ( $\text{Gq}$ )<sup>84,85,87,89</sup>, l'augmentation des concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire ( $\text{Gq}$ )<sup>94-96</sup> et l'inhibition des PKA ( $\text{Gi}$ )<sup>90,91</sup> sont associées avec une diminution des courants  $\text{K}^+$  et à un retard de repolarisation. Des cascades de signalisation indépendantes des protéines  $\text{G}\alpha_q$  sont probablement responsables des différences menant au développement de l'hypertrophie ou de la dilatation des chambres cardiaques pour générer les deux modèles de cardiomyopathie.

## 4.3 Avancement

Les modèles de souris transgéniques sont très utiles en recherche puisqu'ils nous permettent d'étudier en situation *in vivo* le rôle spécifique de certaines protéines en conditions physiologiques et/ou pathologiques. Ces modèles peuvent cibler (1) la fonction d'un organe, (2) un système de régulation, (3) une cascade de signalisation ou, (4) comme c'est le cas ici, l'activation de récepteurs. Les souris surexprimant les récepteurs de type 1 de l'Ang II (AT1R) ou le récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénergique natif ( $\alpha_{1B}$ -AR) spécifiquement au niveau cardiaque nous permettent d'étudier les effets de l'activation des voies de signalisation de ces deux récepteurs sur le cœur sans avoir les effets reliés à des changements hémodynamiques. Il a été ainsi possible d'étudier les effets de l'activation excessive des voies d'activation des récepteurs AT1 et  $\alpha_{1B}$ -adrénergiques (qui survient lors du développement de deux types de cardiomyopathie) sur la repolarisation ventriculaire.

### 4.3.1 Rôle de l'Ang II dans le développement des arythmies

Le projet sur la caractérisation de la repolarisation ventriculaire des souris AT1R montre que la suractivation chronique de la signalisation intracellulaire des récepteurs AT1, affecte directement les courants  $K^+$  et représente un facteur de risque important à la survenue d'arythmies sans modification hémodynamique ni présence de remodelage cardiaque. D'autres études avaient montré que l'Ang II pouvait diminuer les courants  $K^+$  dans des cellules en culture ou chez des animaux traités avec de l'Ang II ou présentant diverses formes de remodelage cardiaque.<sup>117,118,155-159</sup> Toutefois, nous avons réussi à caractériser l'ensemble des courants  $K^+$  et à mesurer l'impact des changements de ces courants ioniques sur la fonction globale du cœur sans que des facteurs confondants tels que l'augmentation de la pression sanguine ou la présence de remodelage cardiaque ne puissent être impliqués. Tous ces changements surviennent avant que l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque se développent et cela signifie qu'ils pourraient participer au

développement de la pathologie et non seulement représenter une conséquence de cette pathologie.

### **4.3.2 Rôle des récepteurs $\alpha$ -adrénergiques dans le développement des arythmies**

L'étude de la repolarisation ventriculaire du modèle de souris  $\alpha_{1B}$ -AR nous a aussi permis de voir que l'activation accrue et persistante de la voie d'activation de ce sous-type de récepteur  $\alpha_1$ -adrénergique est suffisante pour diminuer les courants  $K^+$  de façon importante et induire des arythmies. Comme pour les souris AT1R, les troubles de repolarisation surviennent avant le remodelage cardiaque et indépendamment de changements hémodynamiques et pourraient faire partie du processus menant au développement de la cardiomyopathie. Malgré que les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ont une plus grande importance dans la régulation physiologique de la fonction cardiaque, les résultats obtenus chez les souris  $\alpha_{1B}$ -AR confirment que les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques jouent aussi un rôle important au niveau du cœur en conditions pathologiques.

### **4.3.3 Comparaison des mécanismes de régulation impliqués dans les différents phénotypes**

Les deux modèles de souris transgéniques, les AT1R et les  $\alpha_{1B}$ -AR, représentent deux modèles différents de cardiomyopathie. La comparaison de ces deux modèles nous a montré que malgré que la signalisation intracellulaire activée par ces deux récepteurs soit assez différente pour produire deux phénotypes pathologiques distincts, l'activation des deux récepteurs affecte de façon semblable les courants  $K^+$  et la repolarisation. La comparaison de ces deux modèles transgéniques suggère que les effets sur la régulation des courants  $K^+$  impliquent sensiblement les mêmes mécanismes intracellulaires. Selon nos modèles, il est possible que l'activation de la PLC (par la protéine  $G_{\alpha q}$ ) qui augmente l'activation des PKC et les niveaux de  $Ca^{2+}$  via DAG et  $IP_3$ , et la diminution de l'activation de la PKA (par la protéine  $G_i$ ) soit deux des voies principales de la régulation de la



repolarisation. Alors que si l'on compare les phénotypes pathologiques de chacun des modèles, soit l'hypertrophie ou la dilatation, on peut penser que des voies indépendantes de l'activation des protéines Gq et Gi sont responsables des différences de ces phénotypes. Cette hypothèse n'exclue pas la possibilité que l'activation des protéines G puisse aussi jouer un rôle dans le développement de la pathologie et la progression vers l'insuffisance cardiaque.

Au cours des dernières années, plusieurs études ont émis l'hypothèse que la diminution des courants  $K^+$ , plus particulièrement  $I_{to}$ , lors du remodelage cardiaque pourrait faire partie des étapes du développement de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque et qu'une augmentation des courants  $K^+$  pourrait même renverser le remodelage cardiaque.<sup>204,208-211</sup> Ainsi, la diminution des courants  $K^+$  observée lors du remodelage cardiaque ne serait pas secondaire à la détérioration du phénotype cardiaque, mais ferait plutôt partie des phénomènes favorisant le développement du remodelage, entre autres en prolongeant la durée du potentiel d'action et en modifiant les paramètres d'activation des courants  $Ca^{2+}$ . Nos résultats tendent aussi vers cette hypothèse puisque nos deux modèles de souris transgéniques présentent un retard de repolarisation avant que leur phénotype pathologique respectif ne se développe. Dans ce contexte, la diminution des courants  $K^+$  ne serait toutefois pas responsable des particularités de chacun des phénotypes pathologiques (hypertrophie ou dilatation).

#### **4.3.4 Extrapolation des résultats obtenus avec les deux modèles de souris à la situation physiologique et pathologique humaine**

##### **4.3.4.1 Comparaison des paramètres électrophysiologiques**

Les souris et les humains ont plusieurs différences physiologiques cardiaques. Le rythme cardiaque beaucoup plus rapide des souris nécessite une régulation différente de plusieurs phénomènes. La durée du potentiel d'action plus courte chez la souris implique que certains courants ioniques n'ont pas tout à fait le même rôle.<sup>1</sup> Par exemple,  $I_{to}$  joue un

rôle important chez la souris dans la phase majeure de repolarisation alors qu'il est plutôt responsable de la phase précoce de repolarisation chez l'humain. De plus, les courants  $K^+$  ventriculaires (surtout les courants  $K^+$  à rectification retardée) ne sont pas les mêmes : on retrouve  $I_{Kur}$  et  $I_{ss}$  chez les souris et  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  chez l'humain.<sup>1</sup> Alors comment réconcilier les résultats obtenus chez les souris AT1R et  $\alpha_{1B}$ -AR avec ce qui se produit chez l'humain? Tout d'abord, les récepteurs AT1 et  $\alpha_1$ -adrénergiques sont exprimés au niveau cardiaque chez l'humain et la souris.<sup>168,176</sup> De plus, certains courants ioniques sont les mêmes au niveau ventriculaire chez la souris et l'humain tels que  $I_{to}$ ,  $I_{K1}$  et  $I_{CaL}$ .<sup>1</sup> Il est donc plausible que l'activation excessive des récepteurs AT1 et  $\alpha_1$ -adrénergiques régulent ces courants ioniques de la même façon chez l'humain. Aussi, malgré que  $I_{Kur}$  ne soit pas présent au niveau ventriculaire chez l'homme, on le retrouve au niveau des oreillettes,<sup>1</sup> ce qui laisse croire que  $I_{Kur}$  serait aussi affecté chez l'humain par une activation accrue du système rénine-angiotensine ou du système nerveux sympathique et que l'activation de ces systèmes pourrait affecter la repolarisation des cellules auriculaires.

Malgré les différences physiologiques entre l'humain et la souris, l'utilisation de la souris comme modèle animal peut servir à étudier les mécanismes de régulation de certaines protéines, par exemple déterminer s'il y a une augmentation ou une diminution de l'expression d'une protéine ou voir à quel niveau la régulation est faite (transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle). La souris reste un modèle intéressant à utiliser en raison (1) de son accessibilité, (2) des nombreux modèles transgéniques disponibles et (3) des nombreuses données et connaissances déjà recueillies sur cette espèce qui permettent de mieux comprendre globalement plusieurs phénomènes. Pour mieux extrapoler les résultats obtenus chez la souris à ce qui se passe chez l'humain, il est possible de combiner les études faites dans ce modèle avec des études chez d'autres espèces. Par exemple, on peut utiliser le cobaye qui exprime les courants  $I_{Ks}$  et  $I_{Kr}$  au niveau des ventricules<sup>1</sup> ou le chien qui se rapproche beaucoup des humains mais qui est plus difficile (grosseur de l'animal, grande variabilité entre les races, plus questionnable sur le plan éthique) et plus dispendieux à utiliser.

#### 4.3.4.2 Transposition des modèles transgéniques de cardiomyopathie à la situation pathologique chez l'humain

Les deux modèles de souris transgéniques que nous avons étudiés ont des niveaux très élevés d'expression des récepteurs au niveau du cœur. Ces niveaux d'expression et d'activation des récepteurs AT1 et  $\alpha_1$ -adrénergique artificiellement créés sont certainement plus élevés que l'augmentation réelle de l'activation de ces récepteurs au cours de la cardiomyopathie chez l'humain. Nous avons vu que les récepteurs de type 1 de l'Ang II et les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques sont tous les deux activés au cours du remodelage cardiaque afin de maintenir une fonction cardiaque et un débit sanguin adéquats. De plus, les effets de la surexpression des deux types de récepteurs dans les deux modèles transgéniques sont les mêmes sur la repolarisation. Dans ce contexte, l'activation accrue des deux récepteurs au même moment lors du remodelage cardiaque devrait perturber la repolarisation de façon plus importante que l'activation d'un seul de ces récepteurs puisque les cascades de signalisation impliquées dans la régulation de la repolarisation risquent d'être les mêmes (ou en partie les mêmes). Cette hypothèse est possible seulement dans le cas où l'activation des voies de signalisation n'est pas saturée, mais les deux modèles transgéniques de surexpression de récepteurs spécifiquement au niveau cardiaque ont montré que les voies de signalisation activées par chacun des récepteurs sont capables de supporter de très hauts niveaux d'expression (et d'activation) des récepteurs. Il est ainsi probable que la combinaison de l'activation simultanée des récepteurs de type 1 de l'Ang II et des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques qui survient lors du remodelage cardiaque produise des effets additifs sur la repolarisation. Ce qui pourrait accélérer les perturbations et la détérioration de la fonction cardiaque.

Aucun modèle animal n'est parfait pour reproduire avec exactitude la physiologie et la pathophysiologie humaines. Toutefois, les deux modèles de souris transgéniques que nous avons utilisés comme modèles de cardiomyopathie permettent d'étudier l'activation excessive des récepteurs de l'Ang II ou des récepteurs  $\alpha_{1B}$ -adrénergiques en condition *in*

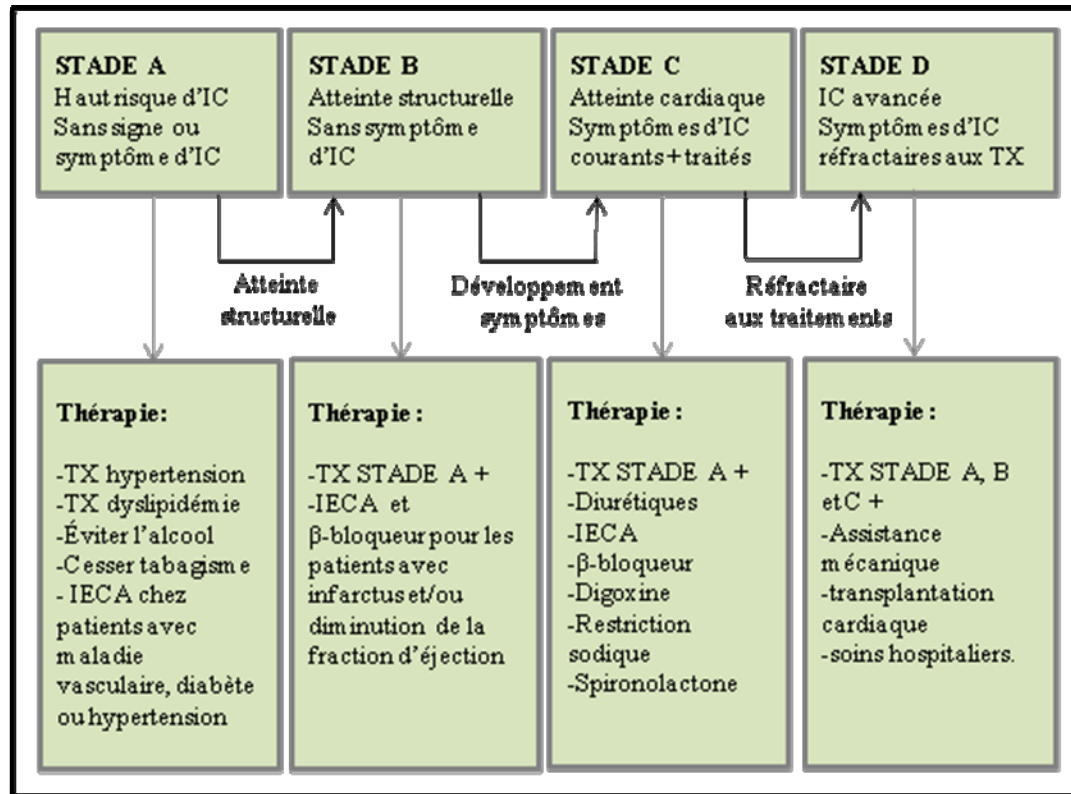
*vivo* et offrent des pistes intéressantes pour expliquer les troubles de repolarisation et l'incidence accrue d'arythmies qui sont associés au remodelage et à l'insuffisance cardiaques.

#### **4.3.4.3 Implication clinique des résultats**

##### *4.5.4.2a Le traitement de l'insuffisance cardiaque*

L'insuffisance cardiaque est un syndrome aigu ou chronique causé par une diminution de la contraction cardiaque ou une perte de la fonction cardiaque. Cette perte de la fonction du cœur implique beaucoup plus que seulement des phénomènes cardiaques. Ainsi, l'activation de mécanismes baroréflexes, l'activation du système nerveux sympathique, la détérioration de la fonction rénale, l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone et l'activation de mécanismes cellulaires tels que l'apoptose font parties des phénomènes généralement associés à l'apparition et au développement de l'insuffisance cardiaque chronique. Les traitements utilisés pour diminuer la progression de la maladie et améliorer la survie des patients insuffisants sont choisis en fonction de ces différents phénomènes pathologiques et selon le degré de l'atteinte cardiaque. L'insuffisance chronique, dont font partie nos deux modèles de cardiomyopathie, progresse selon quatre stades définis dépendamment de l'atteinte du myocarde et des symptômes du patient.<sup>212</sup> (Figure 4.1) Le *STADE A* représente les patients à risque de développer de l'insuffisance cardiaque à cause d'une autre maladie ou de facteurs de risque associés à la perte de la fonction, mais ils n'ont pas de signe ou de symptôme de l'insuffisance. Les patients *STADE B* présentent, quant à eux, des évidences d'une détérioration structurelle du cœur mais n'ont pas de symptôme. L'insuffisance cardiaque classée *STADE C* est caractérisée par une atteinte structurelle du myocarde et est associée avec les symptômes habituels de l'insuffisance cardiaque, tels que l'œdème, la dyspnée, la toux, l'inconfort abdominal, la fatigue, l'extrémité des membres froide, la confusion ou les palpitations. À ce stade, les symptômes diminuent ou disparaissent avec les traitements conventionnels

utilisés chez les patients insuffisants cardiaques. Finalement, les patients en *STADE D* ont de l'insuffisance cardiaque réfractaire aux traitements conventionnels et ont besoin de traitements spéciaux allant jusqu'à la transplantation cardiaque.



**Figure 4.1 Les stades de l'insuffisance cardiaque chronique et les traitements utilisés selon le cas** IC : Insuffisance cardiaque, IECA : Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, TX : traitement (adapté de <sup>212</sup>).

Les patients considérés à haut risque d'insuffisance cardiaque mais qui n'ont pas de symptôme (*STADE A et B*) sont traités et suivis pour contrôler les facteurs de risque associés à la maladie comme l'hypertension, les dyslipidémies ou le diabète. Pour les patients avec symptômes, on utilise des agents pharmacologiques pour diminuer la charge et le stress cardiaques et on essaie d'augmenter la contraction du cœur. Ainsi, selon le cas, la nature de la maladie, le degré de l'atteinte et la réponse du patient au traitement administré, on utilise une combinaison de différents agents qui va prévenir la perte de la fonction ou diminuer la détérioration de celle-ci.

Les études cliniques ont montré que les traitements qui prolongent réellement la vie des patients insuffisants cardiaques sont les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (IECA), les antagonistes des récepteurs de type 1 de l'angiotensine (ARA), les  $\beta$ -bloqueurs (récepteur adrénergique), les antagonistes des récepteurs de l'aldostérone et la combinaison hydralazine-nitrate. Les IECA vont réduire le stress cardiaque en diminuant la résistance périphérique, vont diminuer la relâche de la norépinéphrine (induite par l'Ang II) et vont réduire le remodelage cardiaque et vasculaire. Les ARA vont produire sensiblement les mêmes effets que les IECA et sont surtout utilisés comme traitement de remplacement chez les patients ayant de la toux sèche associée avec l'utilisation des IECA. Les  $\beta$ -bloqueurs sont aussi couramment utilisés pour diminuer la mortalité des patients avec insuffisance cardiaque sévère mais stable. Les effets bénéfiques des  $\beta$ -bloqueurs seraient dus à la diminution de l'action des catécholamines circulants, à une diminution du rythme et du volume cardiaques, à une diminution de la demande en oxygène et à une réduction du remodelage cardiaque. Le principal vasodilatateur utilisé lors de l'insuffisance est la combinaison nitrate-hydralazine qui diminue la charge cardiaque.

#### *4.5.4.2b Utilité clinique des résultats obtenus chez les souris AT1R et $\alpha_{1B}$ -AR*

Les inhibiteurs du système rénine-angiotensine (IECA ou ARA) sont utilisés en première ligne pour traiter et prévenir le remodelage et l'insuffisance cardiaques associés avec une augmentation de la pression sanguine. Leur utilisation est même recommandée chez les patients sans hypertension mais à risque de développer du remodelage cardiaque tel que chez les diabétiques.<sup>65</sup> Les effets secondaires sont négligeables comparativement aux effets bénéfiques sur la prévention et le développement de maladies cardiovasculaires. Ils sont reconnus pour diminuer la pression sanguine et diminuer le remodelage cardiaque. Grâce à l'étude de la repolarisation ventriculaire chez les souris AT1R, nous avons montré que l'activation accrue des voies des récepteurs AT1 produit un retard de repolarisation pouvant être associé avec des arythmies indépendamment du remodelage cardiaque ou de changements hémodynamiques. Ainsi, l'utilisation des IECA ou des ARA pour réduire la

pression sanguine ou pour diminuer le remodelage cardiaque chez les patients insuffisants serait également bénéfique pour empêcher le remodelage électrique et diminuer les risques de développer des arythmies. Les bénéfices associés aux paramètres électriques sont aussi présents pour les patients n'ayant pas de remodelage structurel cardiaque (*STADE A et B*), mais qui ont une activation accrue du système rénine-angiotensine. Les IECA ou les ARA vont empêcher la diminution des courants  $K^+$ , qui prolongeraient la repolarisation et risqueraient de causer des arythmies. De plus, le retard repolarisation survient avant le remodelage cardiaque et il est aussi possible que ces troubles de repolarisation contribuent au développement du remodelage, entre autres, par les effets de la prolongation du potentiel d'action sur l'activation de  $I_{CaL}$ . Ainsi, notre étude montre que l'utilisation de ces agents pharmacologiques pour bloquer les effets d'une trop grande activation de la voie des récepteurs AT1 serait tout indiquée pour prévenir et réduire les risques d'arythmies et de remodelage cardiaque chez les patients avec ou sans remodelage.

D'un autre côté, les antagonistes des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques ont des effets vasodilatateurs. Toutefois, ces agents pharmacologiques ne font pas partie de la stratégie thérapeutique utilisée chez les patients insuffisants cardiaques. En fait, les bloqueurs des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques disponibles à ce jour n'ont pas beaucoup d'indication thérapeutique et sont surtout utiles pour contrôler l'augmentation de la pression sanguine causée spécifiquement par une activation accrue de ces récepteurs adrénérergiques, tels qu'une surdose de médicaments sympathomimétiques ou lors d'un phéochromocytome (tumeur des cellules chromaffines de la médullosurrénale sécrétant des catécholamines). De plus, les bloqueurs des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques sont associés avec des effets secondaires importants et d'autres agents vasodilatateurs ont montré une meilleure efficacité pour prévenir et traiter l'insuffisance cardiaque. Les résultats obtenus au cours du projet sur la repolarisation des souris  $\alpha_{1B}$ -AR ont montré que l'activation accrue de ces récepteurs entraîne du remodelage structurel et électrique sans que la pression sanguine ne soit affectée. En conditions pathologiques, l'activation du récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénérergique est

suffisante pour produire un retard de repolarisation et représente à elle seule un facteur de risque important au développement d'arythmies. Le blocage des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergique au niveau cardiaque pourrait alors s'avérer bénéfique pour diminuer le remodelage électrique et diminuer les risques d'arythmies associés avec l'activation pathologique de ce récepteur. Toutefois, les molécules pharmacologiques disponibles sur le marché n'offrent pas assez de bénéfices et d'avantages comparativement aux effets indésirables de ces agents. Nos résultats suggèrent qu'il serait intéressant de développer d'autres agents pharmacologiques plus spécifiques, plus efficaces et plus sécuritaires qui permettraient de bloquer une trop grande activation de ce récepteur qui est associée au remodelage structural et électrique cardiaque.

#### **4.4 Autres facteurs pouvant contribuer aux arythmies et au remodelage cardiaques**

En plus des troubles de repolarisation, d'autres facteurs peuvent contribuer au développement d'arythmies, influencer le phénotype pathologique cardiaque et favoriser la détérioration de la fonction du myocarde lors du remodelage et de l'insuffisance cardiaque. Nous avons exploré quelques uns de ces facteurs pour tenter d'établir un portrait plus complet du développement de la pathologie par l'activation spécifique des récepteurs de type 1 de l'Ang II ou des récepteurs  $\alpha_{1B}$ -adrénergiques.

##### **4.4.1 Les courants calciques et la régulation de l'homéostasie du $\text{Ca}^{2+}$**

Les troubles de l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  font parties des troubles concomittants les plus souvent associés avec le remodelage et l'insuffisance cardiaque. Le  $\text{Ca}^{2+}$  est impliqué dans la régulation de plusieurs phénomènes cardiaque tels que (1) l'excitabilité électrique via les courants calciques activés durant la phase 2 du potentiel d'action, (2) dans la contraction cellulaire par le couplage excitation-contraction et (3) dans la régulation de l'activité de plusieurs protéines intracellulaires dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ .



#### 4.4.1.1 Les courants calciques

Deux types de courants calciques peuvent être exprimés au niveau des cardiomyocytes, soient le courant  $\text{Ca}^{2+}$  de type L ( $I_{\text{CaL}}$ ) et le courant  $\text{Ca}^{2+}$  de type T ( $I_{\text{CaT}}$ ). En conditions normales,  $I_{\text{CaL}}$  est le seul courant  $\text{Ca}^{2+}$  que l'on retrouve à la membrane des cardiomyocytes de mammifères adultes. L'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  via  $I_{\text{CaL}}$  régule l'excitabilité électrique et initie la relâche massive du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire qui est essentielle pour la contraction cardiaque. Ainsi, des changements dans la densité de ce courant  $\text{Ca}^{2+}$  peuvent affecter la durée du potentiel d'action et augmenter les risques d'arythmies. De plus, l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  via ces courants, est la première étape du couplage excitation-contraction qui est nécessaire pour la contraction des cardiomyocytes. Les données préliminaires que nous avons recueillies chez les souris AT1R et  $\alpha_{1\text{B}}$ -AR nous ont montré que les  $I_{\text{CaL}}$  sont diminués chez les deux groupes de souris transgéniques avec ou sans remodelage cardiaque. L'expression de l'ARNm du canal  $\text{Ca}_v1.2$ , responsable de ce courant  $\text{Ca}^{2+}$ , était aussi diminuée, sauf dans le groupe de souris  $\alpha_{1\text{B}}$ -AR de 2-3 mois. Cette donnée est intéressante par rapport à la différence dans le phénotype pathologique des deux modèles de souris, puisque le  $\text{Ca}^{2+}$  est impliqué dans la régulation de l'activité de protéines intracellulaires dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ , telles que la calmoduline ou les MAPK, qui sont associées au remodelage cardiaque. Il est donc probable que la régulation des phénomènes associés avec le  $\text{Ca}^{2+}$  (courants  $\text{Ca}^{2+}$ , homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$ , cascade de signalisation) présente certaines différences qui pourraient influencer le phénotype ou être influencées par ce phénotype (hypertrophie ou dilatation).

La prolongation du potentiel d'action est présente chez les souris AT1R et les souris  $\alpha_{1\text{B}}$ -AR. Dans ces deux modèles transgéniques, les changements de la densité des courants  $\text{Ca}^{2+}$  ne contribuent pas à prolonger la durée du potentiel d'action. Toutefois, le retard de repolarisation, produit par la diminution des courants  $\text{K}^+$ , peut influencer l'activation des  $I_{\text{CaL}}$  et l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  en prolongeant la durée du potentiel d'action. Dans ce cas, la diminution des courants  $\text{Ca}^{2+}$  observée dans les deux modèles de souris transgéniques

pourrait être un phénomène compensatoire pour tenter de contrôler les niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  entrant dans la cellule.

#### 4.4.1.2 La régulation de l'homéostasie du $\text{Ca}^{2+}$ intracellulaire

Des enregistrements d'échocardiographies faits chez les souris AT1R de 6 mois (Chapitre 2, Figure 5) et les souris  $\alpha_{1\text{B}}\text{-AR}$  de 9-12 mois<sup>179</sup> ont montré que la fonction cardiaque de ces groupes de souris transgéniques présentant du remodelage cardiaque était diminuée. Cette diminution de la fonction cardiaque peut être reliée en partie avec la diminution des courants  $\text{I}_{\text{CaL}}$ . Toutefois, il est aussi possible que les autres protéines responsables de la régulation de l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  soient impliquées dans la diminution de la contraction.

À cause de l'implication du  $\text{Ca}^{2+}$  dans les divers phénomènes cellulaires, les concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaires doivent être étroitement régulées. La relâche massive du  $\text{Ca}^{2+}$  et l'élimination efficace du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique impliquent plusieurs protéines (Chapitre 1). Au niveau du réticulum sarcoplasmique (SR), la pompe  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$  SERCA est responsable de la recapture du  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette protéine est associée avec phospholamban (PLB) qui diminue l'affinité de la pompe pour le  $\text{Ca}^{2+}$  lorsqu'elle est liée avec SERCA. Dans le SR, on retrouve des protéines qui servent de tampon pour le  $\text{Ca}^{2+}$  telles que la calséquestrin (CSQ) qui lie le  $\text{Ca}^{2+}$ . La CSQ facilite la recapture et l'entreposage du  $\text{Ca}^{2+}$ , mais le libère relativement facilement lors de l'activation des récepteurs RyR. Au niveau de la membrane cellulaire, l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) fait sortir le  $\text{Ca}^{2+}$  de la cellule. L'évacuation efficace du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique après chaque contraction est très importante pour permettre la relaxation et contrôler les concentrations intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$ . Les données que nous avons recueillies chez les souris AT1R et celles publiées précédemment chez les souris  $\alpha_{1\text{B}}\text{-AR}$  par Lemire et al.<sup>179</sup> ont montré que l'expression de plusieurs protéines impliquées dans la régulation de l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  est modifiée chez ces deux modèles de souris. Brièvement, les résultats obtenus chez les souris  $\alpha_{1\text{B}}\text{-AR}$  ont montré que la

recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  serait affectée par la surexpression du récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénergique (diminution de SERCA et de CSQ) et que l'évolution de la maladie influence l'expression de ces protéines puisque l'expression de NCX était affectée seulement chez les animaux ayant une fonction ventriculaire diminuée. Les résultats des analyses des niveaux d'expression de ces protéines par Western blot chez les souris AT1R que nous avons obtenus vont dans le même sens que ceux de l'étude sur les souris  $\alpha_{1B}$ -AR, soient que l'activité de SERCA serait diminuée par une augmentation de PLB et que l'expression de la CSQ serait diminuée. Dans les deux modèles de cardiomyopathie, NCX ne tend pas à être augmenté pour compenser la diminution de la recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  par SERCA.

Les résultats des analyses de l'expression protéique montrent que la régulation de l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire serait perturbée par l'activation des récepteurs de l'Ang II et des récepteurs  $\alpha_{1B}$ -adrénergiques. L'évacuation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire lors de la diastole se fait moins efficacement chez les AT1R et les  $\alpha_{1B}$ -AR. Combinés avec la diminution des courants  $\text{Ca}^{2+}$ , ces résultats montrent que les changements de concentrations intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  sont régulés par l'activation des récepteurs AT1 et  $\alpha_{1B}$ -adrénergique. Ces modifications de l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  (diminution des  $I_{\text{CaL}}$  et diminution de l'expression et de l'activité de la pompe SERCA, de CSQ et de NCX) influencent les concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces changements peuvent (1) contribuer au développement d'arythmies en favorisant la relâche spontanée du  $\text{Ca}^{2+}$  entreposé dans le réticulum sarcoplasmique (DAD), (2) affecter la fonction cardiaque et (3) réguler des cascades de signalisation impliquées dans le remodelage cardiaque. Malgré que les deux récepteurs n'activent pas exactement les mêmes voies de signalisation, leur activation excessive mène à des troubles de régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  comparables dans les deux modèles transgéniques (comme pour les courants  $\text{K}^+$ ) qui pourraient être impliqués dans la détérioration de la maladie vers l'insuffisance cardiaque. Les petites différences dans ces paramètres ne sont toutefois pas assez importantes pour être responsables des caractéristiques particulières de chacun des phénotypes.

#### 4.4.2 Les différences entre les mâles et les femelles

Les hormones sexuelles sont un autre facteur important de la régulation de plusieurs paramètres cardiaques. Il est reconnu que les hommes et les femmes présentent une vulnérabilité différente à certains types de pathologies. Par exemple, les femmes ont normalement un intervalle QTc plus long que celui des hommes ce qui les rend plus à risque de développer des arythmies associées avec une prolongation de la repolarisation telles que les Torsades de pointe. Au cours des études sur la repolarisation chez les souris AT1R et  $\alpha_{1B}$ -AR, nous avons recueilli les résultats des souris mâles et femelles de chacune des lignées séparément pour éviter que les hormones n'affectent nos conclusions. La séparation des résultats obtenus chez les mâles et les femelles nous a aussi permis d'étudier les différences entre les sexes en rapport avec l'activation des récepteurs de l'Ang II et des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques.

Selon nos résultats préliminaires, les femelles AT1R et  $\alpha_{1B}$ -AR décèdent en plus grand nombre et plus précocement que les mâles. Nous avons poussé nos recherches avec les femelles AT1R. Cette lignée de souris transgéniques, générée à partir de la lignée C57BL/6, offrent un avantage concernant l'étude des différences mâle /femelle puisque les mâles de cette lignée ont des niveaux d'androgènes (hormones mâles) plus faibles que les mâles d'autres lignées de souris.<sup>213</sup> Ces niveaux faibles d'androgènes, comparables à ceux des femelles, éliminent l'implication des hormones mâles dans les différences entre les mâles et les femelles.<sup>214,215</sup> Dans ce cas, il devient alors possible d'affirmer que les différences entre les souris mâles et femelles AT1R seraient causées par les hormones femelles. Il est important de noter que les souris mâles et femelles  $\alpha_{1B}$ -AR présentent aussi la même différence de mortalité que les souris AT1R.<sup>179</sup> De façon générale, nous avons observé que les troubles de repolarisation sont comparables entre les mâles et les femelles AT1R. Les  $I_{CaL}$  sont aussi diminués chez les femelles AT1R de 50 jours et de 6 mois, mais ils semblent plus affectés chez les jeunes femelles AT1R que dans tous les autres groupes

transgéniques de cette lignée (données non publiées). Nous avons aussi comparé le phénotype pathologique (hypertrophie et remodelage) et évalué la fonction cardiaque (fraction de raccourcissement) des femelles. Nous avons observé que les cœurs des femelles AT1R semblent plus hypertrophiés et présentent plus de remodelage que ceux des mâles. Toutefois, leur fonction cardiaque ne semble pas plus détériorée que celle des mâles (données non publiées). Ainsi, quelques paramètres, principalement les  $I_{CaL}$  et le niveau de remodelage, semblent plus affectés chez les souris femelles AT1R que chez les mâles et pourraient être une piste de réponse pour expliquer les décès plus importants des femelles. D'autres études sont nécessaires pour mieux caractériser ces pistes.

Dans la littérature, des évidences ont montré que les oestrogènes (principale hormone femelle) pourraient interagir avec le système rénine-angiotensine. Par exemple, les oestrogènes augmenteraient la synthèse de l'angiotensinogène et diminueraient l'expression de la rénine et de l'enzyme de conversion de l'angiotensine.<sup>4,203,216</sup> Des études ont aussi montré que les hormones femelles pourraient aussi réguler l'expression des récepteurs de l'Ang II, soit en les diminuant<sup>217</sup> ou en les augmentant.<sup>218,219</sup> La majorité des études semblent toutefois soutenir que les oestrogènes auraient globalement des effets bénéfiques sur le système cardiovasculaire par une diminution générale de l'activation du SRAA. Dans notre modèle de souris AT1R, plusieurs hypothèses pourraient expliquer que les femelles AT1R soient plus affectées que les mâles. Tout d'abord, malgré que les femelles pourraient avoir des niveaux systémiques d'Ang II moins élevés que les mâles (selon les données de la littérature), le très grand niveau d'expression des récepteurs AT1 au niveau cardiaque chez les souris transgéniques permet la liaison importante de l'Ang II et l'activation du récepteur quelque soit les concentrations d'Ang II. Il est aussi possible que les oestrogènes agissent sur la synthèse de l'Ang II systémique, mais que ces hormones aient moins, ou même pas du tout, de contrôle sur la voie de synthèse locale qui serait importante en conditions pathologiques. Selon certaines études, il est aussi possible que les oestrogènes stimulent l'expression des récepteurs AT1 et qu'ainsi les femelles AT1R surexprimeraient le récepteur AT1 encore plus que les mâles. Le niveau d'expression du

récepteur de l'Ang II chez les souris AT1R est au moins 200 fois plus élevé que celui des souris de type sauvage. Toutefois, les niveaux d'expression des récepteurs AT1 des mâles et femelles transgéniques n'a pas été comparés. Finalement, il est aussi possible que les effets des oestrogènes dans la régulation de la pathologie cardiaque des femelles AT1R ne soient pas causés par une interaction spécifique entre les oestrogènes et le SRAA, mais que ces effets soient plutôt causés par l'action des oestrogènes sur les voies de signalisation intracellulaire qui régulent le remodelage et l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$ . Dans notre cas, cette dernière hypothèse semble la plus plausible puisque les femelles  $\alpha_{1B}$ -AR sont aussi plus affectées que les mâles de cette lignée, ce qui écarte le rôle exclusif d'une interaction entre les oestrogènes et le SRAA pour expliquer les différences mâle/femelle dans l'incidence des décès chez les deux modèles de cardiomyopathies.

## 4.5 Perspectives

Les résultats obtenus lors de la caractérisation de la repolarisation ventriculaire chez les souris AT1R et  $\alpha_{1B}$ -AR, ainsi que les données préliminaires que nous avons recueillies sur ces deux modèles, suggèrent plusieurs pistes de recherche qui seraient intéressantes à explorer.

### 4.5.1 Interaction entre le système rénine-angiotensine et le système nerveux sympathique

Le système rénine-angiotensine-aldostérone et le système nerveux sympathique sont tous les deux activés lors du remodelage cardiaque. Ils sont aussi tous les deux associés avec l'activation des protéines Gq. Ces systèmes peuvent aussi se réguler entre eux pour augmenter la réponse physiologique et pathologique et favoriser le remodelage cardiaque. Il serait intéressant de voir si le blocage d'un des deux systèmes pourrait empêcher ou réduire les effets de l'activation de l'autre système et vice versa. Une possibilité de projet serait de traiter les souris AT1R avec un bloqueur des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergique, par exemple avec

le prazosin, pour voir s'il est possible d'empêcher ou de réduire le phénotype (structurel, électrique et mécanique) pathologique cardiaque induit par la surexpression des récepteurs AT1. Et inversement, les souris  $\alpha_{1B}$ -AR pourraient être traitées avec des IECA ou des ARA.

#### 4.5.2 Influence des hormones sexuelles

Les données recueillies chez les souris femelles AT1R et  $\alpha_{1B}$ -AR ont montré que les femelles des deux groupes décèdent plus tôt et en plus grand nombre que les mâles. Les faibles niveaux d'androgènes chez les mâles AT1R (lignée C57BL/6) suggèrent que les hormones femelles seraient responsables de cette plus grande vulnérabilité des femelles transgéniques. Les données préliminaires recueillies lors de la caractérisation de la repolarisation n'ont rien révélé de significatif pouvant expliquer la différence de mortalité entre les mâles et les femelles. Les femelles AT1R présentent plus de remodelage que les mâles, mais leur fonction cardiaque n'est pas plus affectée. Une diminution de la densité de  $I_{CaL}$  a été observée chez les mâles et les femelles AT1R de 50 jours et de 6 mois. Toutefois, la diminution relative du courant calcique est plus importante chez les femelles de 50 jours. Ainsi, des différences dans les courants  $Ca^{2+}$  (et peut-être dans la régulation de l'homéostasie du  $Ca^{2+}$ ) ainsi que dans le remodelage cardiaque pourraient être impliquées dans les différences entre les mâles et les femelles AT1R. Il serait donc intéressant de confirmer le rôle des hormones femelles concernant le taux de mortalité plus important des souris femelles AT1R et  $\alpha_{1B}$ -AR en faisant des ovariectomies chez ces deux groupes de femelles pour déterminer s'il est possible d'éliminer les différences que nous avons observées. Une caractérisation plus détaillée des courants  $I_{CaL}$  et de l'homéostasie du  $Ca^{2+}$  intracellulaire chez les mâles et les femelles AT1R et  $\alpha_{1B}$ -AR pourrait aussi être une piste intéressante quand à la cause des différences mâles/femelles chez les deux modèles de souris transgéniques.

#### 4.6.1 Étude du courant $I_{CaT}$

Peu de données ont été recueillies jusqu'à maintenant sur le rôle des canaux calciques de type T ( $I_{CaT}$ ) dans la cardiomyopathie ainsi que sur sa régulation par différents stimuli. Certaines études ont montré que ces courants sont réexprimés lors du remodelage cardiaque.<sup>20,100</sup> D'autres études ont aussi montré que l'activation des récepteurs de type 1 de l'angiotensine II pourrait aussi augmenter les courants  $Ca^{2+}$  de type T.<sup>100</sup> Dans ce contexte, il serait intéressant de caractériser les  $I_{CaT}$  dans les modèles de souris AT1R et  $\alpha_{1B}$ -AR (jeunes et vieux) afin de voir s'ils ont un rôle dans le développement du remodelage cardiaque de ces deux modèles de cardiomyopathie et s'ils sont régulés de la même façon par deux stimuli différents qui produisent deux types de cardiomyopathie, hypertrophique et dilatée.

### 4.7 Commentaire final

L'étude de la repolarisation ventriculaire des souris surexprimant le récepteur de type 1 de l'angiotensine II ou le récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénergique au niveau cardiaque nous a permis de montrer comment l'Ang II et l'activation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergique favorisent la survenue d'arythmies ventriculaires en retardant la repolarisation. Les deux études ont aussi montré que les effets de ces stimuli sur les courants  $K^+$  se produisent indépendamment de changements hémodynamiques et du remodelage cardiaque. Les résultats des deux études faites chez les souris AT1R et  $\alpha_{1B}$ -AR confirment donc le rôle important de ces stimuli dans le remodelage électrique cardiaque et pourraient servir à orienter la stratégie thérapeutique chez les patients insuffisants cardiaques et aussi chez ceux à risque de développer du remodelage cardiaque.



## Bibliographie

- (1) Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005;85:1205-1253.
- (2) Marieb E, Laurendeau G. *Anatomie et physiologie humaines*. Éditions du Renouveau Pédagogique ed. 1992.
- (3) Keating MT, Sanguinetti MC. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* 2001;104:569-580.
- (4) James AF, Choisy SC, Hancox JC. Recent advances in understanding sex differences in cardiac repolarization. *Prog Biophys Mol Biol* 2007;94:265-319.
- (5) Aehlert B. *ECGs made easy*. Mosby Edition ed. 2002.
- (6) Roden DM. antiarrhythmic Drugs. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. International Edition ed. 2006.
- (7) Tomaselli GF, Marban E. Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999;42:270-283.
- (8) Barry DM, Nerbonne JM. Myocardial potassium channels: electrophysiological and molecular diversity. *Annu Rev Physiol* 1996;58:363-394.
- (9) Follmer CH, Colatsky TJ. Block of delayed rectifier potassium current,  $I_K$ , by flecainide and E-4031 in cat ventricular myocytes. *Circulation* 1990;82:289-293.
- (10) Carmeliet E. Voltage- and time-dependent block of the delayed  $K^+$  current in cardiac myocytes by dofetilide. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;262:809-817.
- (11) Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Two components of cardiac delayed rectifier  $K^+$  current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* 1990;96:195-215.
- (12) Nabauer M, Kaab S. Potassium channel down-regulation in heart failure. *Cardiovasc Res* 1998;37:324-334.

- (13) *Libby Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*, 8th edition. 2007.
- (14) Kaab S, Dixon J, Duc J et al. Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* 1998;98:1383-1393.
- (15) Dixon JE, Shi W, Wang HS et al. Role of the Kv4.3 K<sup>+</sup> channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res* 1996;79:659-668.
- (16) Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A et al. Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* 1996;384:80-83.
- (17) London B, Guo W, Pan X et al. Targeted replacement of KV1.5 in the mouse leads to loss of the 4-aminopyridine-sensitive component of I(K,slow) and resistance to drug-induced qt prolongation. *Circ Res* 2001;88:940-946.
- (18) Brouillette J, Clark RB, Giles WR, Fiset C. Functional properties of K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Physiol* 2004;559:777-798.
- (19) Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* 1988;395:233-253.
- (20) Sen L, Smith TW. T-type Ca<sup>2+</sup> channels are abnormal in genetically determined cardiomyopathic hamster hearts. *Circ Res* 1994;75:149-155.
- (21) Martinez ML, Heredia MP, Delgado C. Expression of T-type Ca(2+) channels in ventricular cells from hypertrophied rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1617-1625.
- (22) Janse MJ. Electrophysiological changes in heart failure and their relationship to arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res* 2004;61:208-217.
- (23) Shah M, Akar FG, Tomaselli GF. Molecular basis of arrhythmias. *Circulation* 2005;112:2517-2529.
- (24) Chiang CE. Congenital and acquired long QT syndrome. Current concepts and management. *Cardiol Rev* 2004;12:222-234.

- (25) Crotti L, Celano G, Dagradi F, Schwartz PJ. Congenital long QT syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2008;3:18.
- (26) Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* 2008;70:23-49.
- (27) Bers DM. Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res* 2000;87:275-281.
- (28) Bashore TM, Granger CB, Hranitzky P, Patel MR. *Current medical diagnosis and treatment*. 48th Edition ed. New York: 2009.
- (29) Varma DR, Deng XF. Cardiovascular alpha1-adrenoceptor subtypes: functions and signaling. *Can J Physiol Pharmacol* 2000;78:267-292.
- (30) Ikeda U, Tsuruya Y, Yaginuma T. Alpha 1-adrenergic stimulation is coupled to cardiac myocyte hypertrophy. *Am J Physiol* 1991;260:H953-H956.
- (31) Miki N, Hamamori Y, Hirata K et al. Transforming growth factor-beta 1 potentiated alpha 1-adrenergic and stretch-induced c-fos mRNA expression in rat myocardial cells. *Circ Res* 1994;75:8-14.
- (32) D'Angelo DD, Sakata Y, Lorenz JN et al. Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:8121-8126.
- (33) Thorburn J, Thorburn A. The tyrosine kinase inhibitor, genistein, prevents alpha-adrenergic-induced cardiac muscle cell hypertrophy by inhibiting activation of the Ras-MAP kinase signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;202:1586-1591.
- (34) Molkenstein JD, Dorn GW. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol* 2001;63:391-426.
- (35) Dhanasekaran N, Dermott JM. Signaling by the G12 class of G proteins. *Cell Signal* 1996;8:235-245.
- (36) Kurose H. Galpha12 and Galpha13 as key regulatory mediator in signal transduction. *Life Sci* 2003;74:155-161.
- (37) Hermans E, Challiss RA. Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 2001;359:465-484.

- (38) Neumann J, Schmitz W, Scholz H, von ML, Doring V, Kalmar P. Increase in myocardial Gi-proteins in heart failure. *Lancet* 1988;2:936-937.
- (39) Hershberger RE, Feldman AM, Bristow MR. A1-adenosine receptor inhibition of adenylate cyclase in failing and nonfailing human ventricular myocardium. *Circulation* 1991;83:1343-1351.
- (40) Bohm M, Gierschik P, Knorr A, Larisch K, Weismann K, Erdmann E. Desensitization of adenylate cyclase and increase of Gi alpha in cardiac hypertrophy due to acquired hypertension. *Hypertension* 1992;20:103-112.
- (41) Bohm M, Kirchmayr R, Erdmann E. Myocardial Gi alpha-protein levels in patients with hypertensive cardiac hypertrophy, ischemic heart disease and cardiogenic shock. *Cardiovasc Res* 1995;30:611-618.
- (42) Knowlton KU, Michel MC, Itani M et al. The alpha 1A-adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular, and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* 1993;268:15374-15380.
- (43) Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 1993;75:977-984.
- (44) Shubeita HE, McDonough PM, Harris AN et al. Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* 1990;265:20555-20562.
- (45) Adams JW, Sakata Y, Davis MG et al. Enhanced Galphaq signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:10140-10145.
- (46) LaMorte VJ, Thorburn J, Absher D et al. Gq- and ras-dependent pathways mediate hypertrophy of neonatal rat ventricular myocytes following alpha 1-adrenergic stimulation. *J Biol Chem* 1994;269:13490-13496.
- (47) Sakata Y, Hoit BD, Liggett SB, Walsh RA, Dorn GW. Decompensation of pressure-overload hypertrophy in G alpha q-overexpressing mice. *Circulation* 1998;97:1488-1495.

- (48) Crespo P, Xu N, Simonds WF, Gutkind JS. Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 1994;369:418-420.
- (49) Pumiglia KM, LeVine H, Haske T, Habib T, Jove R, Decker SJ. A direct interaction between G-protein beta gamma subunits and the Raf-1 protein kinase. *J Biol Chem* 1995;270:14251-14254.
- (50) Dorn GW, Force T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 2005;115:527-537.
- (51) Gruver CL, DeMayo F, Goldstein MA, Means AR. Targeted developmental overexpression of calmodulin induces proliferative and hypertrophic growth of cardiomyocytes in transgenic mice. *Endocrinology* 1993;133:376-388.
- (52) Wang Y, Huang S, Sah VP et al. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem* 1998;273:2161-2168.
- (53) Liang Q, Molkentin JD. Redefining the roles of p38 and JNK signaling in cardiac hypertrophy: dichotomy between cultured myocytes and animal models. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:1385-1394.
- (54) Frey N, McKinsey TA, Olson EN. Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat Med* 2000;6:1221-1227.
- (55) Molkentin JD, Lu JR, Antos CL et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 1998;93:215-228.
- (56) Sussman MA, Lim HW, Gude N et al. Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science* 1998;281:1690-1693.
- (57) Thorburn A, Thorburn J, Chen SY et al. HRas-dependent pathways can activate morphological and genetic markers of cardiac muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem* 1993;268:2244-2249.
- (58) Rajapurohitam V, Javadov S, Purdham DM, Kirshenbaum LA, Karmazyn M. An autocrine role for leptin in mediating the cardiomyocyte hypertrophic effects of angiotensin II and endothelin-1. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:265-274.
- (59) Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 1993;73:413-423.

- (60) Tu X, Miao L, Kang Y et al. Effects of dl-praeruptorin A on cultured neonatal rat ventricular cardiomyocytes with hypertrophy induced by endothelin-1. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2009;31:231-236.
- (61) Singal T, Dhalla NS, Tappia PS. Phospholipase C may be involved in norepinephrine-induced cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:1015-1019.
- (62) Boluyt MO, Zheng JS, Younes A et al. Rapamycin inhibits alpha 1-adrenergic receptor-stimulated cardiac myocyte hypertrophy but not activation of hypertrophy-associated genes. Evidence for involvement of p70 S6 kinase. *Circ Res* 1997;81:176-186.
- (63) Zeng C, Zhou Y, Liu G, Sun W. The signal transduction pathway causing the synergistic hypertrophic effects of neuropeptide Y and norepinephrine on primary cardiomyocyte. *Neuropeptides* 2001;35:211-218.
- (64) de Jonge HW, Dekkers DH, Houtsmuller AB, Sharma HS, Lamers JM. Differential Signaling and Hypertrophic Responses in Cyclically Stretched vs Endothelin-1 Stimulated Neonatal Rat Cardiomyocytes. *Cell Biochem Biophys* 2007;47:21-32.
- (65) I.A.Reid. *Basic and clinical pharmacology, 11th Ed.* 2009.
- (66) Xu XP, Best PM. Decreased transient outward K<sup>+</sup> current in ventricular myocytes from acromegalic rats. *Am J Physiol* 1991;260:H935-H942.
- (67) Meszaros J, Ryder KO, Hart G. Transient outward current in catecholamine-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Am J Physiol* 1996;271:H2360-H2367.
- (68) Qin D, Zhang ZH, Caref EB, Boutjdir M, Jain P, El-Sherif N. Cellular and ionic basis of arrhythmias in postinfarction remodeled ventricular myocardium. *Circ Res* 1996;79:461-473.
- (69) Potreau D, Gomez JP, Fares N. Depressed transient outward current in single hypertrophied cardiomyocytes isolated from the right ventricle of ferret heart. *Cardiovasc Res* 1995;30:440-448.
- (70) Rozanski GJ, Xu Z, Whitney RT, Murakami H, Zucker IH. Electrophysiology of rabbit ventricular myocytes following sustained rapid ventricular pacing. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:721-732.
- (71) Kaab S, Nuss HB, Chiamvimonvat N et al. Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res* 1996;78:262-273.

- (72) Tsuji Y, Opthof T, Kamiya K et al. Pacing-induced heart failure causes a reduction of delayed rectifier potassium currents along with decreases in calcium and transient outward currents in rabbit ventricle. *Cardiovasc Res* 2000;48:300-309.
- (73) Thuringer D, Coulombe A, Deroubaix E, Coraboeuf E, Mercadier JJ. Depressed transient outward current density in ventricular myocytes from cardiomyopathic Syrian hamsters of different ages. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:387-401.
- (74) Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. Alterations of K<sup>+</sup> currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993;73:379-385.
- (75) Kaab S, Dixon J, Duc J et al. Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* 1998;98:1383-1393.
- (76) Barbieri M, Varani K, Cerbai E et al. Electrophysiological basis for the enhanced cardiac arrhythmogenic effect of isoprenaline in aged spontaneously hypertensive rats. *J Mol Cell Cardiol* 1994;26:849-860.
- (77) Brooksby P, Levi AJ, Jones JV. The electrophysiological characteristics of hypertrophied ventricular myocytes from the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 1993;11:611-622.
- (78) Li Q, Keung EC. Effects of myocardial hypertrophy on transient outward current. *Am J Physiol* 1994;266:H1738-H1745.
- (79) Kleiman RB, Houser SR. Outward currents in normal and hypertrophied feline ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1989;256:H1450-H1461.
- (80) Furukawa T, Myerburg RJ, Furukawa N, Kimura S, Bassett AL. Metabolic inhibition of I<sub>Ca,L</sub> and I<sub>K</sub> differs in feline left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol* 1994;266:H1121-H1131.
- (81) Li GR, Lau CP, Ducharme A, Tardif JC, Nattel S. Transmural action potential and ionic current remodeling in ventricles of failing canine hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H1031-H1041.

- (82) Ryder KO, Bryant SM, Hart G. Membrane current changes in left ventricular myocytes isolated from guinea pigs after abdominal aortic coarctation. *Cardiovasc Res* 1993;27:1278-1287.
- (83) Koumi S, Backer CL, Arentzen CE. Characterization of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel in human cardiac myocytes. Alterations in channel behavior in myocytes isolated from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1995;92:164-174.
- (84) Nakamura TY, Coetzee WA, Vega-Saenz De ME, Artman M, Rudy B. Modulation of Kv4 channels, key components of rat ventricular transient outward K<sup>+</sup> current, by PKC. *Am J Physiol* 1997;273:H1775-H1786.
- (85) Schrader LA, Ren Y, Cheng F, Bui D, Sweatt JD, Anderson AE. Kv4.2 is a locus for PKC and ERK/MAPK cross-talk. *Biochem J* 2009;417:705-715.
- (86) van der Heyden MA, Wijnhoven TJ, Opthof T. Molecular aspects of adrenergic modulation of the transient outward current. *Cardiovasc Res* 2006;71:430-442.
- (87) Apkon M, Nerbonne JM. Alpha 1-adrenergic agonists selectively suppress voltage-dependent K<sup>+</sup> current in rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:8756-8760.
- (88) Dirksen RT, Sheu SS. Modulation of ventricular action potential by alpha 1-adrenoceptors and protein kinase C. *Am J Physiol* 1990;258:H907-H911.
- (89) Matavel A, Lopes CM. PKC activation and PIP(2) depletion underlie biphasic regulation of IKs by Gq-coupled receptors. *J Mol Cell Cardiol* 2009;46:704-712.
- (90) Chen J, Sroubek J, Krishnan Y, Li Y, Bian J, McDonald TV. PKA phosphorylation of HERG protein regulates the rate of channel synthesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296:H1244-H1254.
- (91) Mason HS, Latten MJ, Godoy LD, Horowitz B, Kenyon JL. Modulation of Kv1.5 currents by protein kinase A, tyrosine kinase, and protein tyrosine phosphatase requires an intact cytoskeleton. *Mol Pharmacol* 2002;61:285-293.
- (92) Li GR, Feng J, Wang Z, Fermini B, Nattel S. Adrenergic modulation of ultrarapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current in human atrial myocytes. *Circ Res* 1996;78:903-915.
- (93) Chen J, Chen K, Sroubek J et al. Post-transcriptional control of human ether-a-go-go-related gene potassium channel protein by alpha-adrenergic receptor stimulation. *Mol Pharmacol* 2010;78:186-197.
- (94) Wagner S, Hacker E, Grandi E et al. Ca/calmodulin kinase II differentially modulates potassium currents. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2009;2:285-294.



- (95) Li J, Marionneau C, Zhang R et al. Calmodulin kinase II inhibition shortens action potential duration by upregulation of K<sup>+</sup> currents. *Circ Res* 2006;99:1092-1099.
- (96) Xiao L, Coutu P, Villeneuve LR et al. Mechanisms underlying rate-dependent remodeling of transient outward potassium current in canine ventricular myocytes. *Circ Res* 2008;103:733-742.
- (97) Schroder F, Handrock R, Beuckelmann DJ et al. Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle. *Circulation* 1998;98:969-976.
- (98) Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* 1992;85:1046-1055.
- (99) Beuckelmann DJ, Erdmann E. Ca(2+)-currents and intracellular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-transients in single ventricular myocytes isolated from terminally failing human myocardium. *Basic Res Cardiol* 1992;87 Suppl 1:235-243.
- (100) Ferron L, Capuano V, Ruchon Y, Deroubaix E, Coulombe A, Renaud JF. Angiotensin II signaling pathways mediate expression of cardiac T-type calcium channels. *Circ Res* 2003;93:1241-1248.
- (101) Gidh-Jain M, Huang B, Jain P, El-Sherif N. Differential expression of voltage-gated K<sup>+</sup> channel genes in left ventricular remodeled myocardium after experimental myocardial infarction. *Circ Res* 1996;79:669-675.
- (102) Mori Y, Matsubara H, Folco E, Siegel A, Koren G. The transcription of a mammalian voltage-gated potassium channel is regulated by cAMP in a cell-specific manner. *J Biol Chem* 1993;268:26482-26493.
- (103) Matsubara H, Suzuki J, Inada M. Shaker-related potassium channel, Kv1.4, mRNA regulation in cultured rat heart myocytes and differential expression of Kv1.4 and Kv1.5 genes in myocardial development and hypertrophy. *J Clin Invest* 1993;92:1659-1666.
- (104) Zhang ZJ, Jurkiewicz NK, Folander K, Lazarides E, Salata JJ, Swanson R. K<sup>+</sup> currents expressed from the guinea pig cardiac IsK protein are enhanced by activators of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1766-1770.
- (105) Adams JP, Anderson AE, Varga AW et al. The A-type potassium channel Kv4.2 is a substrate for the mitogen-activated protein kinase ERK. *J Neurochem* 2000;75:2277-2287.

- (106) Studer R, Reinecke H, Bilger J et al. Gene expression of the cardiac Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res* 1994;75:443-453.
- (107) Moalic JM, Charlemagne D, Mansier P, Chevalier B, Swynghedauw B. Cardiac hypertrophy and failure--a disease of adaptation. Modifications in membrane proteins provide a molecular basis for arrhythmogenicity. *Circulation* 1993;87:IV21-IV26.
- (108) Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 1990;322:1561-1566.
- (109) Luu M, Stevenson WG, Stevenson LW, Baron K, Walden J. Diverse mechanisms of unexpected cardiac arrest in advanced heart failure. *Circulation* 1989;80:1675-1680.
- (110) Stevenson WG, Stevenson LW, Middlekauff HR, Saxon LA. Sudden death prevention in patients with advanced ventricular dysfunction. *Circulation* 1993;88:2953-2961.
- (111) Veldkamp MW, Verkerk AO, van Ginneken AC et al. Norepinephrine induces action potential prolongation and early afterdepolarizations in ventricular myocytes isolated from human end-stage failing hearts. *Eur Heart J* 2001;22:955-963.
- (112) Nuss HB, Kaab S, Kass DA, Tomaselli GF, Marban E. Cellular basis of ventricular arrhythmias and abnormal automaticity in heart failure. *Am J Physiol* 1999;277:H80-H91.
- (113) Ben-David J, Zipes DP, Ayers GM, Pride HP. Canine left ventricular hypertrophy predisposes to ventricular tachycardia induction by phase 2 early afterdepolarizations after administration of BAY K 8644. *J Am Coll Cardiol* 1992;20:1576-1584.
- (114) Yan GX, Rials SJ, Wu Y et al. Ventricular hypertrophy amplifies transmural repolarization dispersion and induces early afterdepolarization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H1968-H1975.
- (115) Aronson RS. Afterpotentials and triggered activity in hypertrophied myocardium from rats with renal hypertension. *Circ Res* 1981;48:720-727.

- (116) Cohn JN, Levine TB, Olivari MT et al. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 1984;311:819-823.
- (117) Domenighetti AA, Boixel C, Cefai D, Abriel H, Pedrazzini T. Chronic angiotensin II stimulation in the heart produces an acquired long QT syndrome associated with IK1 potassium current downregulation. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:63-70.
- (118) Xiao HD, Fuchs S, Campbell DJ et al. Mice with cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme (ACE) have atrial enlargement, cardiac arrhythmia, and sudden death. *Am J Pathol* 2004;165:1019-1032.
- (119) Rials SJ, Wu Y, Xu X, Filart RA, Marinchak RA, Kowey PR. Regression of left ventricular hypertrophy with captopril restores normal ventricular action potential duration, dispersion of refractoriness, and vulnerability to inducible ventricular fibrillation. *Circulation* 1997;96:1330-1336.
- (120) de GM, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000;52:415-472.
- (121) Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:931-936.
- (122) Jackson E.K. Renin and Angiotensin. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. International Edition ed. 2006.
- (123) Mazzolai L, Nussberger J, Aubert JF et al. Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system. *Hypertension* 1998;31:1324-1330.
- (124) Timmermans PB, Chiu AT, Herblin WF, Wong PC, Smith RD. Angiotensin II receptor subtypes. *Am J Hypertens* 1992;5:406-410.
- (125) Timmermans PB, Benfield P, Chiu AT, Herblin WF, Wong PC, Smith RD. Angiotensin II receptors and functional correlates. *Am J Hypertens* 1992;5:221S-235S.
- (126) Dostal DE, Baker KM. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circ Res* 1999;85:643-650.

- (127) Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J Clin Invest* 1990;86:1913-1920.
- (128) Lindpaintner K, Jin MW, Niedermaier N, Wilhelm MJ, Ganten D. Cardiac angiotensinogen and its local activation in the isolated perfused beating heart. *Circ Res* 1990;67:564-573.
- (129) Bader M. Role of the local renin-angiotensin system in cardiac damage: a minireview focussing on transgenic animal models. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:1455-1462.
- (130) Dostal DE. The cardiac renin-angiotensin system: novel signaling mechanisms related to cardiac growth and function. *Regul Pept* 2000;91:1-11.
- (131) Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem* 1990;265:22348-22357.
- (132) Guimaraes S, Pinheiro H. Functional evidence that in the cardiovascular system AT1 angiotensin II receptors are AT1B prejunctionally and AT1A postjunctionally. *Cardiovasc Res* 2005;67:208-215.
- (133) Steckelings UM, Kaschina E, Unger T. The AT2 receptor--a matter of love and hate. *Peptides* 2005;26:1401-1409.
- (134) Miura S, Saku K, Karnik SS. Molecular analysis of the structure and function of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertens Res* 2003;26:937-943.
- (135) Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 1991;351:233-236.
- (136) Hunyady L, Catt KJ, Clark AJ, Gaborik Z. Mechanisms and functions of AT(1) angiotensin receptor internalization. *Regul Pept* 2000;91:29-44.
- (137) Hein L, Meinel L, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK. Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT1 and AT2 receptors: evidence for selective sorting of receptor and ligand. *Mol Endocrinol* 1997;11:1266-1277.

- (138) Ozono R, Wang ZQ, Moore AF, Inagami T, Siragy HM, Carey RM. Expression of the subtype 2 angiotensin (AT<sub>2</sub>) receptor protein in rat kidney. *Hypertension* 1997;30:1238-1246.
- (139) Wagenaar LJ, Voors AA, Buikema H, van Gilst WH. Angiotensin receptors in the cardiovascular system. *Can J Cardiol* 2002;18:1331-1339.
- (140) Barber MN, Sampey DB, Widdop RE. AT<sub>2</sub> receptor stimulation enhances antihypertensive effect of AT<sub>1</sub> receptor antagonist in hypertensive rats. *Hypertension* 1999;34:1112-1116.
- (141) Moore AF, Heiderstadt NT, Huang E et al. Selective inhibition of the renal angiotensin type 2 receptor increases blood pressure in conscious rats. *Hypertension* 2001;37:1285-1291.
- (142) Becker WM, Kleinsmith LJ, Hardin J. *The world of the cell, 4th Ed.* The benjamin/cummings Imprint ed. 2000.
- (143) Sattoru E, Tadashi I. Signal transduction of angiotensin II type 1 receptor throughreceptor tyrosine kinase. *Regulatory Peptides* 2000;91:13-20.
- (144) Tanimoto K, Sugiyama F, Goto Y et al. Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J Biol Chem* 1994;269:31334-31337.
- (145) Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J Clin Invest* 1990;86:1913-1920.
- (146) Busatto VC, Cicilini MA, Mill JG. Increased angiotensin-converting enzyme activity in the left ventricle after infarction. *Braz J Med Biol Res* 1997;30:679-687.
- (147) Paul M, Pinto YM, Schunkert H, Ganten D, Bohm M. Activation of the renin-angiotensin system in heart failure and hypertrophy--studies in human hearts and transgenic rats. *Eur Heart J* 1994;15 Suppl D:63-67.
- (148) Tian XL, Pinto YM, Costerousse O et al. Over-expression of angiotensin converting enzyme-1 augments cardiac hypertrophy in transgenic rats. *Hum Mol Genet* 2004;13:1441-1450.

- (149) Pfeffer MA, Lamas GA, Vaughan DE, Parisi AF, Braunwald E. Effect of captopril on progressive ventricular dilatation after anterior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1988;319:80-86.
- (150) Baker KM, Chernin MI, Wixson SK, Aceto JF. Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am J Physiol* 1990;259:H324-H332.
- (151) Hayabuchi Y, Standen NB, Davies NW. Angiotensin II inhibits and alters kinetics of voltage-gated K(+) channels of rat arterial smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H2480-H2489.
- (152) Fujii N, Tanaka M, Ohnishi J et al. Alterations of angiotensin II receptor contents in hypertrophied hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;212:326-333.
- (153) Hein L, Stevens ME, Barsh GS, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ. Overexpression of angiotensin AT1 receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:6391-6396.
- (154) Pachori AS, Wang H, Gelband CH, Ferrario CM, Katovich MJ, Raizada MK. Inability to induce hypertension in normotensive rat expressing AT(1) receptor antisense. *Circ Res* 2000;86:1167-1172.
- (155) Matsuda H, Kurata Y, Imanishi S, Sato R, Shibamoto T. Effects of angiotensin II on sustained outward currents in rat ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 2004;448:54-62.
- (156) Shimoni Y. Inhibition of the formation or action of angiotensin II reverses attenuated K<sup>+</sup> currents in type 1 and type 2 diabetes. *J Physiol* 2001;537:83-92.
- (157) Shimoni Y, Liu XF. Gender differences in ANG II levels and action on multiple K<sup>+</sup> current modulation pathways in diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H311-H319.
- (158) Shimoni Y, Hunt D, Chuang M, Chen KY, Kargacin G, Severson DL. Modulation of potassium currents by angiotensin and oxidative stress in cardiac cells from the diabetic rat. *J Physiol* 2005;567:177-190.

- (159) Kasi VS, Xiao HD, Shang LL et al. Cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme overexpression causes conduction defects and connexin dysregulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H182-H192.
- (160) De Mello WC. Intracellular angiotensin II regulates the inward calcium current in cardiac myocytes. *Hypertension* 1998;32:976-982.
- (161) Saygili E, Rana OR, Saygili E et al. Losartan prevents stretch-induced electrical remodeling in cultured atrial neonatal myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H2898-H2905.
- (162) Cerbai E, Crucitti A, Sartiani L et al. Long-term treatment of spontaneously hypertensive rats with losartan and electrophysiological remodeling of cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 2000;45:388-396.
- (163) Zhang C, Yasuno S, Kuwahara K et al. Blockade of angiotensin II type 1 receptor improves the arrhythmia morbidity in mice with left ventricular hypertrophy. *Circ J* 2006;70:335-341.
- (164) Gonzalez-Juanatey JR, Garcia-Acuna JM, Pose A et al. Reduction of QT and QTc dispersion during long-term treatment of systemic hypertension with enalapril. *Am J Cardiol* 1998;81:170-174.
- (165) Naccarella F, Naccarelli GV, Maranga SS et al. Do ACE inhibitors or angiotensin II antagonists reduce total mortality and arrhythmic mortality? A critical review of controlled clinical trials. *Curr Opin Cardiol* 2002;17:6-18.
- (166) Westfall TC, Westfall DP. Adrenergic agonists and antagonists. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. International Edition ed. 2006.
- (167) Xiao RP, Zhu W, Zheng M et al. Subtype-specific alpha1- and beta-adrenoceptor signaling in the heart. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:330-337.
- (168) Brodde OE, Michel MC. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* 1999;51:651-690.
- (169) Leier CV, Binkley PF, Cody RJ. Alpha-adrenergic component of the sympathetic nervous system in congestive heart failure. *Circulation* 1990;82:I68-I76.

- (170) Endoh M, Blinks JR. Actions of sympathomimetic amines on the  $\text{Ca}^{2+}$  transients and contractions of rabbit myocardium: reciprocal changes in myofibrillar responsiveness to  $\text{Ca}^{2+}$  mediated through alpha- and beta-adrenoceptors. *Circ Res* 1988;62:247-265.
- (171) Corr PB, Shayman JA, Kramer JB, Kipnis RJ. Increased alpha-adrenergic receptors in ischemic cat myocardium. A potential mediator of electrophysiological derangements. *J Clin Invest* 1981;67:1232-1236.
- (172) Allely MC, Brown CM, Kenny BA, Kilpatrick AT, Martin A, Spedding M. Modulation of alpha 1-adrenoceptors in rat left ventricle by ischaemia and acyl carnitines: protection by ranolazine. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;21:869-873.
- (173) Woodcock EA, Du XJ, Reichelt ME, Graham RM. Cardiac alpha 1-adrenergic drive in pathological remodelling. *Cardiovasc Res* 2008;77:452-462.
- (174) Shannon R, Chaudhry M. Effect of alpha1-adrenergic receptors in cardiac pathophysiology. *Am Heart J* 2006;152:842-850.
- (175) Shen H, Peri KG, Deng XF, Chemtob S, Varma DR. Distribution of alpha1-adrenoceptor subtype proteins in different tissues of neonatal and adult rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2000;78:237-243.
- (176) Li K, He H, Li C, Sirois P, Rouleau JL. Myocardial alpha1-adrenoceptor: inotropic effect and physiologic and pathologic implications. *Life Sci* 1997;60:1305-1318.
- (177) Uchi J, Sasaki H, Morimoto S et al. Interaction of alpha1-adrenoceptor subtypes with different G proteins induces opposite effects on cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *Circ Res* 2008;102:1378-1388.
- (178) Grupp IL, Lorenz JN, Walsh RA, Boivin GP, Rindt H. Overexpression of alpha1B-adrenergic receptor induces left ventricular dysfunction in the absence of hypertrophy. *Am J Physiol* 1998;275:H1338-H1350.
- (179) Lemire I, Ducharme A, Tardif JC et al. Cardiac-directed overexpression of wild-type alpha1B-adrenergic receptor induces dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H931-H938.
- (180) Akhter SA, Milano CA, Shotwell KF et al. Transgenic mice with cardiac overexpression of alpha1B-adrenergic receptors. In vivo alpha1-adrenergic



- receptor-mediated regulation of beta-adrenergic signaling. *J Biol Chem* 1997;272:21253-21259.
- (181) Kurz T, Yamada KA, DaTorre SD, Corr PB. Alpha 1-adrenergic system and arrhythmias in ischaemic heart disease. *Eur Heart J* 1991;12 Suppl F:88-98.
  - (182) O'Connell TD, Ishizaka S, Nakamura A et al. The alpha(1A/C)- and alpha(1B)-adrenergic receptors are required for physiological cardiac hypertrophy in the double-knockout mouse. *J Clin Invest* 2003;111:1783-1791.
  - (183) Rokosh DG, Stewart AF, Chang KC et al. Alpha1-adrenergic receptor subtype mRNAs are differentially regulated by alpha1-adrenergic and other hypertrophic stimuli in cardiac myocytes in culture and in vivo. Repression of alpha1B and alpha1D but induction of alpha1C. *J Biol Chem* 1996;271:5839-5843.
  - (184) Gaughan JP, Hefner CA, Houser SR. Electrophysiological properties of neonatal rat ventricular myocytes with alpha1-adrenergic-induced hypertrophy. *Am J Physiol* 1998;275:H577-H590.
  - (185) Milano CA, Dolber PC, Rockman HA et al. Myocardial expression of a constitutively active alpha 1B-adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:10109-10113.
  - (186) Michel MC, Hanft G, Gross G. Functional studies on alpha 1-adrenoceptor subtypes mediating inotropic effects in rat right ventricle. *Br J Pharmacol* 1994;111:539-546.
  - (187) McCloskey DT, Turnbull L, Swigart P, O'Connell TD, Simpson PC, Baker AJ. Abnormal myocardial contraction in alpha(1A)- and alpha(1B)-adrenoceptor double-knockout mice. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:1207-1216.
  - (188) Gambassi G, Spurgeon HA, Ziman BD, Lakatta EG, Capogrossi MC. Opposing effects of alpha 1-adrenergic receptor subtypes on Ca<sup>2+</sup> and pH homeostasis in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1998;274:H1152-H1162.
  - (189) Han C, Abel PW, Minneman KP. Alpha 1-adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca<sup>2+</sup> in smooth muscle. *Nature* 1987;329:333-335.
  - (190) Tohse N, Hattori Y, Nakaya H, Kanno M. Effects of alpha-adrenoceptor stimulation on electrophysiological properties and mechanics in rat papillary muscle. *Gen Pharmacol* 1987;18:539-546.

- (191) Fedida D, Shimoni Y, Giles WR. Alpha-adrenergic modulation of the transient outward current in rabbit atrial myocytes. *J Physiol* 1990;423:257-277.
- (192) Ravens U, Wang XL, Wettwer E. Alpha adrenoceptor stimulation reduces outward currents in rat ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;250:364-370.
- (193) Magnano AR, Suleman S, Garan H, Bloomfield DM. Autonomic modulation of the U wave during phenylephrine and esmolol infusions. *J Electrocardiol* 2005;38:152-156.
- (194) Pignier C, Fares N, Potreau D. Effects of adrenergic stimulation on postnatal development and calcium current in newborn rat cardiomyocytes in primary culture. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31:262-270.
- (195) Maki T, Gruver EJ, Davidoff AJ et al. Regulation of calcium channel expression in neonatal myocytes by catecholamines. *J Clin Invest* 1996;97:656-663.
- (196) Bian J, Cui J, McDonald TV. HERG K(+) channel activity is regulated by changes in phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate. *Circ Res* 2001;89:1168-1176.
- (197) Thomas D, Wu K, Wimmer AB et al. Activation of cardiac human ether-a-go-go related gene potassium currents is regulated by alpha(1A)-adrenoceptors. *J Mol Med* 2004;82:826-837.
- (198) Culling W, Penny WJ, Cunliffe G, Flores NA, Sheridan DJ. Arrhythmogenic and electrophysiological effects of alpha adrenoceptor stimulation during myocardial ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1987;19:251-258.
- (199) Terzic A, Pucoat M, Vassort G, Vogel SM. Cardiac alpha 1-adrenoceptors: an overview. *Pharmacol Rev* 1993;45:147-175.
- (200) Lee JH, Rosen MR. Modulation of delayed afterdepolarisations by alpha 1 adrenergic receptor subtypes. *Cardiovasc Res* 1993;27:839-844.
- (201) Benoit MJ, Rindt H, Allen BG. Cardiac-specific transgenic overexpression of alpha1B-adrenergic receptors induce chronic activation of ERK MAPK signalling. *Biochem Cell Biol* 2004;82:719-727.
- (202) Gurney A, Manoury B. Two-pore potassium channels in the cardiovascular system. *Eur Biophys J* 2009;38:305-318.

- (203) Charpentier F. Understanding the cardiac role of K2P channels: a new TASK for electrophysiologists. *Cardiovasc Res* 2007;75:5-6.
- (204) Li H, Guo W, Mellor RL, Nerbonne JM. KChIP2 modulates the cell surface expression of Kv 1.5-encoded K(+) channels. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39:121-132.
- (205) Fermini B, Fossa AA. The impact of drug-induced QT interval prolongation on drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:439-447.
- (206) Fedida D, Wible B, Wang Z et al. Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K<sup>+</sup> channel current. *Circ Res* 1993;73:210-216.
- (207) Zitron E, Gunth M, Scherer D et al. Kir2.x inward rectifier potassium channels are differentially regulated by adrenergic  $\alpha$ 1A receptors. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44:84-94.
- (208) Wickenden AD, Lee P, Sah R, Huang Q, Fishman GI, Backx PH. Targeted expression of a dominant-negative K(v)4.2 K(+) channel subunit in the mouse heart. *Circ Res* 1999;85:1067-1076.
- (209) Zobel C, Kassiri Z, Nguyen TT, Meng Y, Backx PH. Prevention of hypertrophy by overexpression of Kv4.2 in cultured neonatal cardiomyocytes. *Circulation* 2002;106:2385-2391.
- (210) Kassiri Z, Zobel C, Nguyen TT, Molkentin JD, Backx PH. Reduction of I(to) causes hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res* 2002;90:578-585.
- (211) Lebeche D, Kaprielian R, del MF et al. In vivo cardiac gene transfer of Kv4.3 abrogates the hypertrophic response in rats after aortic stenosis. *Circulation* 2004;110:3435-3443.
- (212) Mudd JO, Field M, Kasper E. 11-Heart Failure. *Piccini & Nilsson: The osler medical Handbook*. 2nd ed. 2006.
- (213) Brouillette J, Rivard K, Lizotte E, Fiset C. Sex and strain differences in adult mouse cardiac repolarization: importance of androgens. *Cardiovasc Res* 2005;65:148-157.
- (214) Trepanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res* 2001;89:437-444.
- (215) Brouillette J, Trepanier-Boulay V, Fiset C. Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *J Physiol* 2003;546:403-413.

- (216) Fischer M, Baessler A, Schunkert H. Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2002;53:672-677.
- (217) Nickenig G, Baumer AT, Grohe C et al. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation* 1998;97:2197-2201.
- (218) Ricchiuti V, Lian CG, Oestreicher EM et al. Estradiol increases angiotensin II type 1 receptor in hearts of ovariectomized rats. *J Endocrinol* 2009;200:75-84.
- (219) Baiardi G, Macova M, Armando I, Ando H, Tyurmin D, Saavedra JM. Estrogen upregulates renal angiotensin II AT1 and AT2 receptors in the rat. *Regul Pept* 2005;124:7-17.

## Annexe 1

### CV Scientifique

#### Publications

##### Articles:

- 1- Rivard K., Grandy S.A.\*, Douillette A., Paradis P., Nemer M., Allen B.G. & Fiset C. Ventricular  $\text{Ca}^{2+}$  handling is altered in transgenic mice with cardiac specific overexpression of the human type I angiotensin II receptor, *Accepté American Journal of Physiology (Heart and Circ Physiol)*
- 2- Rivard K. Trépanier-Boulay V., Rindt H. & Fiset C., Electrical remodeling in a transgenic Mouse Model of  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor overexpression, *American Journal of Physiology (Heart and Circ Physiol)*, 2009; 296(3): H704-18..
- 3- Rivard K., Paradis P. Nemer M. & Fiset C., Cardiac-specific overexpression of the human type 1 angiotensine II receptor causes delayed repolarization, *Cardiovascular Research*, 2008; 78 : 53-62.
- 4- Brouillette J., Rivard K., Lizotte E., Fiset C. Sex- and Strain-Differences in Adult Mouse Cardiac Repolarization: Importance of Androgens. *Cardiovascular Research*. 2005; 65(1):148-157.

##### Présentations :

- 1-Rivard K. Mathieu S., Paradis P., Nemer M. et Fiset C. Sex differences in sudden cardiac death is associated with chronic stimulation of type 1 angiotensin II receptor in mice, Canadian Institute of Health research (CIHR), 2010. Toronto (Canada), (oral)
- 2-Rivard K. Mathieu S., Nemer M., Paradis P. et Fiset C. La surexpression cardiaque du récepteur de type 1 de l'angiotensine II (AT1R) est associée à une diminution du courant calcique de type L chez les souris mâles et femelles, 78<sup>e</sup> congrès de l'ACFAS, Montréal,Qc ,2010. (oral)
- 3-Rivard K. Mathieu S., Nemer M. and Fiset C. Reductions in ventricular  $\text{Ca}^{2+}$  current occur independently of cardiac remodelling in transgenic mice with cardiac specific overexpression of the human type 1 angiotensin II receptor, *Biophysical Society*, 54<sup>th</sup> annual meeting, San Francisco(Californie, États-Unis) 2010. (par affiche)

- 4- Rivard K., Grandy S. & Fiset C. La surexpression du récepteur de type 1 de l'angiotensine II au niveau cardiaque affecte le courant calcique de type L et la relâche du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire chez la souris, XIIe Journée de la recherche, ICM, 2009 (par affiche).
- 5- Rivard K. & Fiset C. The effects of cardiac-specific overexpression of the Ang II type 1 receptor or of the  $\alpha_{1B}$ -AR receptor on the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in transgenic mice, ISHR, Cincinnati USA, 2008 (affiche).
- 6- Rivard K., Grandy S. & Fiset C. La surexpression du récepteur de type 1 de l'Ang II (AT1R) au niveau cardiaque affecte le courant  $\text{Ca}^{2+}$  de type L et la relâche du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire chez la souris, XIe Journée de la recherche, ICM, 2008 (présentation orale).
- 7- Rivard K., Paradis P., Nemer M. & Fiset C. Reduction of the L-Type  $\text{Ca}^{2+}$  current in transgenic mouse models of hypertrophy and heart failure, Symposium, Géprom, 2008 (par affiche).
- 8- Rivard K., Lupien M-A., Paradis P., Nemer M. & Fiset C. Réduction des courants calciques cardiaques dans des modèles transgéniques d'hypertrophie et d'insuffisance cardiaques, X<sup>e</sup> Journée de la recherche de l'Institut de cardiologie de Montréal, 2007 (par affiche).
- 9- Rivard K., Paradis P., Nemer M. & Fiset C. Remodelage électrique cardiaque chez les souris surexprimant le récepteur de type 1 de l'angiotensine II au niveau cardiaque. Groupe de recherche universitaire sur le médicament (GRUM), Montréal (Québec, Canada) 2007 (par affiche).
- 10- Rivard K., Paradis P., Nemer M. & Fiset C. Electrical remodeling in a transgenic mouse model of cardiac-specific overexpression of type 1 angiotensin II receptor, Association of faculties of pharmacy of Canada, Annual AFPC Conference, Montréal (Québec, Canada) 2007 (par affiche).
- 11- Rivard K., Paradis P., Nemer M. & Fiset C. L'activation chronique du récepteur de type 1 de l'angiotensine II au niveau cardiaque entraîne un remodelage électrique chez la souris, GRRC, XXIV congrès, Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux, Tours (France) 2007 (par affiche).
- 12- Rivard K., Paradis P., Nemer M. & Fiset C. La stimulation chronique du récepteur de type 1 de l'angiotensine II au niveau cardiaque prolonge la repolarisation chez la souris, 48<sup>e</sup> réunion annuelle du Club de recherche clinique du Québec; St-Alexis-des-Monts (Québec, Canada) 2006 (par affiche).

13- Rivard K., Paradis P., Nemer M., Fiset C. La surexpression du récepteur de type 1 de l'angiotensine II prolonge la repolarisation cardiaque chez la souris, IX Journée de la recherche de l'Institut de cardiologie de Montréal, 2006 (par affiche).

14- Rivard K., Paradis P., Nemer M., Fiset C., Delayed repolarization in mice overexpressing human type 1 angiotensin II receptor, Keystone symposia, Cardiac arrhythmias: Linking Structural Biology to Gene Defects, Tahoe City (Californie, États-Unis) 2006 (par affiche).

15- Rivard K., Paradis P., Nemer M., Fiset C., Retard de repolarisation chez la souris transgénique surexprimant le récepteur de type 1 de l'angiotensine II, VIII Journée de la recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal, 2005 (orale).

16- Brouillette J., Rivard K., Lizotte E., Fiset C. Importance of androgens on cardiac repolarization: Study on different strains of mice. 49<sup>th</sup> Annual meeting of the Biophysical Society. *Biophysical Journal*, Long Beach (Californie, États-Unis) 2005 (par affiche).

### ***Bourses et Distinctions***

|                     |   |  |
|---------------------|---|--|
| <b>2009</b>         | Bourse de rédaction                         | Thèse                                  |
| <b>2007</b>         | FES / Université de Montréal                | Mémoire<br>Liste d'honneur du<br>Doyen |
| <b>Avril 2007 -</b> | FRSQ  | Formation au doctorat                  |
| <b>2006-2007</b>    | Faculté de pharmacie/Université de Montréal | Bourse de recrutement                  |
| <b>2006</b>         | Club de recherche clinique du Québec        | Finaliste prix Hans Selye              |
| <b>Jan 2006</b>     | Keystone symposia scholarship               | Qualité du résumé                      |
| <b>Mai 2005</b>     | VIIIe Journée de la Recherche de l'ICM      | 1 <sup>er</sup> prix / Présentation    |